

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ana M. Krivokuća

**MUTACIJE U GENIMA KOJI DOPRINOSE
RIZIKU ZA OBOLJEVANJE OD
KARCINOMA DOJKE I/ILI JAJNIKA KOD
BRCA1 I *BRCA2* NEGATIVNIH
VISOKORIZIČNIH PORODICA U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ana M. Krivokuća

**MUTATIONS IN BREAST CANCER
SUSCEPTIBILITY GENES IN *BRCA1* AND
BRCA2 NEGATIVE HEREDITARY BREAST
AND OVARIAN CANCER FAMILIES IN
SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

INFORMACIJE O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentori:

dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

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

Član komisije:

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

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu genetiku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od 2009. do 2014. godine.

Veliku zahvalnost dugujem svima koji su mi pomogli u izradi ovog rada:

Svojim mentorkama dr Mirjani Branković-Magić i dr Marini Stamenković-Radak zahvaljujem na ukazanom poverenju, korisnim sugestijama u toku izrade rada i celokupnoj podršci. Takođe im zahvaljujem na izuzetnoj predusretljivosti, ekspeditivnosti i angažovanosti prilikom oblikovanja ove teze.

Članu komisije, dr Siniši Raduloviću, rukovodiocu projekta u okviru koga je urađen ovaj rad, zahvaljujem na kritičkoj analizi disertacije kao i na podršci koju nam ukazuje u našim istraživanjima, putovanjima i stručnim usavršavanjima.

Zahvaljujem se dr Zvonku Magiću i svim članovima njegove laboratorije Odeljenja za molekularnu medicinu Instituta za medicinska istraživanja VMA koji su mi uvek u prijatnoj atmosferi nesebično pomagali oko sekvenciranja. Zahvaljujem se dr Srdjanu Novakoviću i njegovim saradnicima iz Odeljenja za molekularnu dijagnostiku Onkološkog instituta u Ljubljani, koji su me srdačno primili i obučili za izvodjenje MLPA i HRM metoda. Neizmernu zahvalnost dugujem i dr Javieru Benitez, direktoru Grupe za humanu genetiku Nacionalnog centra za istraživanje raka u Madridu (CNIO), koji je pokazao veliko interesovanje za moj projekat i uključio me u sve aspekte naučnog istraživanja njegovog odeljenja. Svim njegovim saradnicima, posebno Kiri i Ali, zahvaljujem na srdačnosti i prijateljstvu koji su moj boravak u Madridu učinili nezaboravnim. Hvala i dr Miljani Tanić na velikoj pomoći i preporuci. Zahvaljujem se dr Zorici Tomašević i dr Danieli Kolarević-Ivanković na ažurnosti i efikasnosti u sakupljanju uzoraka za banku tumora dojke.

Dr Radmili Janković, šefu Laboratorije za molekularnu genetiku, zahvaljujem se na podršci i pozitivnom pristupu mojim idejama i radu. Posebno se zahvaljujem mojim dragim prijateljicama i koleginicama iz Laboratorije za molekularnu genetiku Emini, Mileni, Jeleni, Kseniji, Miljani, Katarini, Ivani i Dijani, na ogromnoj podršci i pomoći kao i beskrajnim diskusijama i analizama rezultata eksperimentalnog rada. Zahvaljujem se i Lani, Zakiju, Manji, Filipu, kao i svim kolegama Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, na moralnoj podršci, prijateljstvu, i na svim zabavnim temama u pauzama za kafu, koje su mi uvek podizale raspoloženje. Takođe, zahvaljujem se svim laboratorijskim tehničarima

Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju na velikoj pomoći, a posebno Maji koja mi je neumorno pomagala u svakodnevnom radu.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i dragim ljudima iz raznih krajeva sveta na podršci. Milena, tvoj pristup radu mi je bio inspiracija i motiv.... Vojine, hvala ti na svemu, tvoja podrška mi mnogo znači...

Iznad svega, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami i bratu, za njihovu ljubav i beskrajnu podršku koja mi je uvek pružala vetar u leđa i dala snagu da istrajem.

Ovu tezu posvećujem mom tati koji bi bio ponosan na mene.

MUTACIJE U GENIMA KOJI DOPRINOSU RIZIKU ZA OBOLJEVANJE OD KARCINOMA DOJKE I/ILI JAJNIKA KOD *BRCA1* I *BRCA2* NEGATIVNIH VISOKORIZIČNIH PORODICA U SRBIJI

Rezime

Uvod: Nasledni karcinom čini 5-10% od svih slučajeva karcinoma dojke i prvenstveno je povezan sa štetnim mutacijama u visoko penetrabilnim genima *BRCA1* i *BRCA2*. I pored intenzivnog istraživanja ostatka nasledne komponente, treći visoko penetrabilni gen u karcinomu dojke (*BRCA3*) još uvek nije pronađen. Pod okriljem poligenog modela otkrivene su tri grupe alela koji doprinose riziku za karcinom dojke: visoko penetrabilni, koji povećavaju rizik na 40-85% (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*), srednje penetrabilni (povećavaju rizik na 20-40%) kao što su *CHEK2*, *RAD51*, *RAD51C* i *XRCC1*, i učestale genske varijante koje su nisko penetrabilne. Pored štetnih mutacija u ovim genima, određene polimorfne varijante mogu uticati na efikasnost popravke grešaka u DNK i na nastanak karcinoma.

Cilj: Obzirom da prisustvo mutacija u *BRCA1/2* genima ne može da opiše celu genetičku osnovu naslednog karcinoma dojke, cilj ovog rada je istraživanje prisustva populaciono specifičnih mutacija u drugim genima (*TP53*, *CHEK2*, *NBS1*, *RAD51*, *RAD51C* i *XRCC1*) kod *BRCA1/2* negativnog, naslednog karcinoma dojke u Srbiji. Utvrđivanje asocijacije polimorfničkih varijanti u ovim genima sa rizikom za nastanak karcinoma dojke, kao i njihove korelacije sa parametrima tumora i parametrima domaćina tumora, predstavlja dodatni cilj ovog rada.

Materijal i metode: 57 ispitanika poreklom iz visokorizičnih porodica kod kojih je sekvenciranje *BRCA1/2* gena dalo negativan rezultat (nasledni uzorak) i 107 pacijentkinja sa karcinomom dojke koji nije određen u odnosu na porodičnu istoriju bolesti (sistematski uzorak), uključeno je u ovu studiju. Kontrolnu grupu je činilo 114 briseva grlića materice zdravih žena sa normalnim Papa nalazom i bez prethodne istorije pre-kancerskih i

kancerskih lezija. Veliki genski rearanžmani u *BRCA1/2* genima su ispitivani MLPA metodom, a utvrđivanje prisustva mutacija u *CHEK2* genu je radjeno alelski specifičnim PCR-om. *RAD51C* gen je ispitivan DHPLC tehnikom, a detekcija štetnih mutacija u *TP53* i *NBS1* genima je radjena uz pomoć HRM metode. Sve detektovane mutacije i profili koji su odstupali od kontrolnih su sekvencirani. Polimorfne varijante u *TP53*, *RAD51* i *XRCC1* su analizirane RFLP metodom. Za statističku obradu podataka korišćeni su Fišerov egzaktni, χ^2 i *odds-ratio* testovi.

Rezultati: MLPA tehnikom je pokazano odsustvo velikih genskih rearanžmana u *BRCA1/2* genima u naslednom karcinomu dojke. U istoj grupi nisu pronadjene 1100delC u *CHEK2* i 657del5 u *NBS1* genu. Kod obolelih mlađjih od 40 godina iz grupe naslednog karcinoma, nisu pronadjene promene u 8. egzonu *TP53* gena. Detektovana je jedna Del5395 mutacija u *CHEK2* genu (1/57) sa učestalošću od 1,7% u ispitivanoj grupi.

Analiza celog kodirajućeg regiona i egzon-intron granica *RAD51C* gena u naslednom karcinomu dojke pokazala je 5 promena: 2 *missense* (c.790G>A i c.859A>G), jednu intronsku (c.904+34T>C), jednu u 5'UTR (c.1-26C>T) i jednu u promotorskom regionu gena (c.1-118G>A).

Ispitivanje Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena pokazalo je njegovu statistički značajnu vezu sa naslednim oblikom karcinoma dojke i to kod nosilaca Pro alela (Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg: OR=2,34; 95%CI=1,17-4,70).

Nosioci C alela *RAD51* 135G>C polimorfne varijante u homozigotnom stanju, imaju značajno povećan rizik za oboljevanje od karcinoma dojke ukoliko u porodici imaju više obolelih (C/C vs. C/G+G/G: OR=10,28; 95%CI=1,12-94,5). Ispitivanje asocijacije *RAD51* 135G>C polimorfizma sa karakteristikama biološkog ponašanja tumora pokazalo je razliku u distribuciji C/C+G/C vs. G/G genotipova izmedju ER- i ER+ karcinoma (OR= 2,65; 95% CI=0,96-7,34). Pokazana je i asocijacija ovog polimorfizma sa prognostički najlošijim oblicima karcinoma dojke (*triple-negative* karcinomi).

Ispitivanje *XRCC1* Arg399Gln polimorfizma pokazalo je povećan rizik za oboljevanje od naslednog karcinoma dojke za nosioce Gln alela (OR=4,47; 95% CI=1,64-12,2). Značajna veza Gln alela sa rizikom za oboljevanje pokazana je i kod mlađjih od 40 godina (OR=3,36; 95%CI=1,30-8,70). Poredjenje naslednog i sistematskog karcinoma dojke

pokazalo je značajnu vezu Gln alela sa naslednim oblikom bolesti (OR=3,05; 95% CI=1,09-8,47). Ispitivanje asocijacije *XRCCI* Arg399Gln polimorfizma sa histološkim karakteristikama tumora pokazalo je razliku u distribuciji genotipova Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg između invazivnih duktalnih i lobularnih karcinoma ($\chi^2=4,29$; OR=2,92; 95% CI=1,03- 8,28).

Zaključak: Nedostatak velikih genskih rearanžmana u *BRCA1/2* genima u ispitivanoj grupi, kao i štetnih mutacija u *TP53*, *RAD51C* i *NBS1* genima, ukazuje na potrebu analize prisustva mutacija u drugim srednje penetrabilnim genima, koji bi eventualno objasnili naslednu predispoziciju i povećan rizik za oboljevanje u uzorku visokorizičnih, *BRCA1/2* negativnih porodica. Prisustvo *CHEK2* Del5395 mutacije ohrabruje dalja istraživanja ove promene i njenog mogućeg osnivačkog efekta u Srbiji. Ispitivane polimorfne varijante *TP53*, *RAD51* i *XRCCI* gena su asociirane sa povećanim rizikom za oboljevanje od karcinoma dojke, naročito naslednog oblika ove bolesti. *RAD51* 135G>C se pokazao i kao faktor koji je povezan sa prognostički najlošijim oblikom karcinoma dojke (*triple-negative*).

Ključne reči: nasledni karcinom dojke i jajnika, poligeni model, SNPovi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

UDK broj: 611.69-006.04:575.222 (043.3)

MUTATIONS IN BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY GENES IN *BRCA1* AND *BRCA2* NEGATIVE HEREDITARY BREAST AND OVARIAN CANCER FAMILIES IN SERBIA

Abstract

Background: 5-10% of all breast cancer cases are hereditary, and are often caused by deleterious mutations in high penetrance *BRCA1* and *BRCA2* genes. Despite significant efforts in unraveling the rest of the familial component, *BRCA3* could not be identified. Under the polygenic model of inheritance, three groups of genetic predisposition alleles have been identified so far: high-risk genes, conferring 40–85% lifetime risk (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*), moderate-risk genes (20–40% lifetime risk) including *CHEK2*, *RAD51*, *RAD51C* and *XRCC1*, and low-risk common alleles. Besides the deleterious mutations in these genes, certain polymorphic variants have functional significance in DNA repair pathways, and may be responsible for cancer development.

Aim: Considering the fact that mutations in *BRCA1/2* can't explain the whole range of hereditary predisposition to breast cancer, we aimed to investigate the presence and frequency of population-specific mutations in other susceptibility genes (*TP53*, *CHEK2*, *NBS1*, *RAD51*, *RAD51C* and *XRCC1*) in *BRCA1/2* negative hereditary breast cancer cases in Serbia. Determining association between polymorphic variants in these genes with breast cancer risk, as well as their correlation with patient's characteristics and histological and pathological characteristics of breast cancer, were also the aims of this study.

Material and methods: 57 subjects from high-risk families negative for small alterations in *BRCA1/2* genes (hereditary group) and 107 breast cancer patients non-selected according to family history (consecutive group) were included in the study. The control group was consisted of 114 cervical smears of gynecological healthy women with normal Papa test results and without previous history of pre-cancer and cancer lesions. Large genomic rearrangements in *BRCA1/2* genes were investigated by MLPA technique, while

genotyping for specific *CHEK2* mutations was done by allele specific PCR. The coding region of *RAD51C* was assessed through DHPLC method, and detection of *TP53* and *NBS1* deleterious mutations was done by HRM. All suspected mutations, or profiles that differed from the control ones, were confirmed by direct sequencing. Polymorphic variants in *TP53*, *RAD51* and *XRCC1* were analyzed by RFLP method. Fisher exact, χ^2 and odds-ratio tests were employed for statistical analysis.

Results: MLPA method revealed the absence of large genomic rearrangements in *BRCA1/2* genes in the high-risk, hereditary group. This group was also negative for 1100delC mutation in *CHEK2*, and 657del5 in *NBS1* genes. Young breast cancer patients from this group (≤ 40 years) were screened for deleterious mutations in 8. exon of *TP53*, but they showed no alterations in this genomic region. One Del5395 in *CHEK2* was detected in the same group (1/57) which makes its frequency of 1,7% in the tested group.

Screening the whole coding region and exon-intron boundaries of *RAD51C* gene in the hereditary group revealed 5 DNA alterations including two *missense* (c.790G>A and c.859A>G), one intronic (c.904+34T>C), one variant in the 5'UTR (c.1-26C>T) and one variant in the promoter region of the gene (c.1-118G>A).

Regarding the Arg72Pro *TP53* polymorphism, we found statistically important correlation of Pro allele with cancer development among subject from hereditary group (Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg: OR=2,34; 95%CI=1,17-4,70).

Considering *RAD51* 135G>C polymorphism, 135C allele carriers in homozygous state have significantly higher risk for developing breast cancer if they also had family history of the disease (C/C vs. C/G+G/G: OR=10,28; 95% CI=1,12-94,5). Investigation of association of *RAD51* 135G>C polymorphism with histological characteristics of breast cancer showed difference in distribution of C/C+G/C vs. G/G genotypes between ER- and ER+ carcinomas ($\chi^2=3,67$; OR= 2,65; 95% CI=0,96-7,34). We also showed association of *RAD51* 135G>C with triple negative breast carcinomas which have the worst prognostic outcome.

XRCC1 Arg399Gln polymorphism showed high risk for hereditary form of breast cancer for Gln allele carriers (OR=4,47; 95% CI=1,64-12,2). Gln allele importance was shown also for younger than 40 years (OR=3,36; 95% CI=1,30-8,70). Comparing hereditary and consecutive groups we showed significant association of Gln allele with hereditary disease

(OR=3,05; 95%CI=1,09-8,47). Investigation of Arg399Gln association with histological characteristics of breast cancer showed difference in distribution of Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg genotypes between invasive ductal and invasive lobular carcinoma ($\chi^2=4,29$; OR=2,92; 95% CI=1,03- 8,28).

Conclusion: The absence of large genomic rearrangements in *BRCA1/2* genes as well as truncating mutations in *TP53*, *RAD51C* and *NBS1* genes indicates that deleterious mutations in other breast cancer susceptibility genes may account for the increased susceptibility in our cohort of high-risk *BRCA1/2* negative families. The presence of *CHEK2* Del5395 mutation encourages its further examination as possible *founder* mutation in Serbian population. *RAD51*, *TP53* and *XRCC1* polymorphic variants are associated with higher risk for breast cancer development, especially in hereditary form of the disease. Polymorphic variant *RAD51* 135G>C can be predictor for the triple-negative disease, the type of breast cancer that has the worst prognostic outcome.

Keywords: hereditary breast and ovarian cancer, polygenic model, susceptibility genes, SNPs

Academic expertise: Biology

Field of academic expertise: Molecular genetics

UDK number: 611.69-006.04:575.222 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. KANCER.....	1
1.2. NASLEDNA PREDISPOZICIJA ZA KANCER.....	2
1.2.1. Genetička osnova kancera.....	3
1.2.1.1. Onkogeni.....	3
1.2.1.2. Tumor supresorski geni.....	4
1.3. KARCINOM DOJKE.....	5
1.3.1. Epidemiologija.....	5
1.3.2. Faktori rizika za razvoj karcinoma dojke.....	6
1.3.3. Histopatološke forme karcinoma dojke.....	7
1.3.3.1. TNM klasifikacija karcinoma dojke.....	8
1.3.3.2. Histološki stepen diferenciranosti tumora (gradus tumora).....	9
1.3.3.3. Biološki markeri karcinoma dojke.....	10
1.3.3.4. Patološke karakteristike <i>BRCA1/2</i> zavisnih karcinoma dojke.....	11
1.3.3.5. Molekularni podtipovi karcinoma dojke.....	12
1.4. NASLEDNI KARCINOM DOJKE I JAJNIKA.....	12
1.5. POLIGENI MODEL NASLEDNOG KARCINOMA DOJKE.....	13
1.5.1. Visoko penetrabilni geni u karcinomu dojke.....	15
1.5.1.1. <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> , gradja i funkcija.....	16
1.5.1.2. Mutacije u <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> genima.....	19
1.5.1.2.1. Veliki genski rearanžmani u <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> genima.....	21
1.5.1.3. <i>TP53</i> , gradja i funkcija.....	21
1.5.1.3.1. Mutacije u <i>TP53</i> genu.....	24
1.5.1.3.2. <i>Arg72Pro</i> polimorfizam <i>TP53</i> gena.....	24
1.5.2. Srednje penetrabilni geni u karcinomu dojke.....	25
1.5.2.1. <i>CHEK2</i> , gradja i funkcija.....	26
1.5.2.1.1. Mutacije u <i>CHEK2</i> genu.....	28
1.5.2.2. <i>RAD51</i> i <i>RAD51C</i> , gradja i funkcija.....	29
1.5.2.2.1. <i>RAD51</i> i <i>RAD51C</i> mutacije.....	33
1.5.2.3. <i>NBS1</i> (<i>NBN/Nibrin</i>), gradja i funkcija.....	34
1.5.2.3.1. Mutacije u <i>NBS1</i> genu.....	36
1.5.2.4. <i>XRCC1</i> , gradja i funkcija.....	37
1.5.2.4.1. Mutacije u <i>XRCC1</i> genu.....	39
1.5.3. Nisko penetrabilni geni u karcinomu dojke.....	40
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	41
3. MATERIJAL I METODE.....	42
3.1. ISPITANICI.....	42

3.1.1.	Uzorak naslednog karcinoma dojke/jajnika	42
3.1.2.	Sistematski uzorak karcinoma dojke	44
3.1.3.	Kontrolna grupa.....	45
3.2.	IZOLOVANJE GENOMSKE DNK.....	46
3.2.1.	Izolovanje DNK na aparatu <i>ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation</i>	46
3.3.	MERENJE KONCENTRACIJE DNK	47
3.4.	MULTIPLEKS LIGACIONO ZAVISNA AMPLIFIKACIJA PROBA	48
3.4.1.	Detekcija velikih genskih rearanžmana u <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> genima MLPA metodom.....	49
3.5.	ALELSKI SPECIFIČNI PCR.....	51
3.5.1.	Detekcija <i>CHEK2</i> 1100delC mutacije alelski specifičnim PCR-om.....	52
3.5.2.	Detekcija <i>CHEK2</i> Del5395 mutacije alelski specifičnim PCR-om.....	54
3.6.	ELEKTROFOREZA NA AGAROSNOM GELU	56
3.7.	DENATURISUĆA TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI..	56
3.8.	ANALIZA KRIVE TOPLJENJA VISOKE REZOLUCIJE.....	59
3.8.1.	Detekcija mutacija u <i>TP53</i> genu HRM metodom	61
3.8.2.	Detekcija mutacije 657del5 u <i>NBS1</i> genu HRM metodom	62
3.9.	ANALIZA POLIMORFIZMA DUŽINE RESTRIKCIONIH FRAGMENTA	63
3.9.1.	Detekcija <i>RAD51</i> 135G>C polimorfizma RFLP metodom.....	63
3.9.2.	Detekcija <i>TP53</i> Arg72Pro (R72P) polimorfizma RFLP metodom	65
3.9.3.	Detekcija <i>XRCC1</i> Arg399Gln polimorfizma RFLP metodom.....	66
3.10.	ELEKTROFOREZA NA POLIAKRILAMIDNOM GELU	67
3.11.	ELEKTROFOREZA NA AGILENT 2100 BIOANALYZER SISTEMU	68
3.12.	AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK.....	69
3.12.1.	Prečišćavanje PCR produkata <i>ExoI</i> i <i>SAP</i> enzimima	69
3.12.2.	Obeležavanje DNK pre sekvenciranja (<i>Cycle sequencing</i> reakcija)	70
3.12.3.	Prečišćavanje produkata <i>cycle sequencing-a BigDye XTerminator Purification Kit</i> -om.....	70
3.12.4.	Sekvenciranje DNK.....	71
3.13.	STATISTIČKE METODE	71
4.	REZULTATI.....	72
4.1.	VELIKI GENSKI REARANŽMANI U <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> i <i>CHEK2</i> GENIMA	72
4.2.	DETEKCIJA MUTACIJA U <i>CHEK2</i> GENU.....	73
4.2.1.	Detekcija 1100delC mutacije.....	73
4.2.2.	Detekcija Del5395 mutacije	74
4.3.	DETEKCIJA MUTACIJA U <i>RAD51C</i> GENU.....	75
4.4.	DETEKCIJA MUTACIJA U <i>TP53</i> GENU	77

4.4.1.	Raspodela genotipova polimorfne varijante kodona 72 <i>TP53</i> gena u naslednom karcinomu dojke, sistematskom karcinomu dojke i kontrolnoj grupi.....	78
4.4.2.	Ispitivanje asocijacije polimorfne varijante kodona 72 <i>TP53</i> gena sa naslednim i sistematskim karcinomom dojke.....	80
4.4.3.	Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante kodona 72 <i>TP53</i> gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora sistematskog uzorka karcinoma dojke.....	81
4.5.	DETEKCIJA 657del5 MUTACIJE U NBS1 GENU	84
4.6.	POLIMORFIZAM RAD51 GENA 135G>C.....	84
4.6.1.	Raspodela genotipova polimorfne varijante 5'UTR <i>RAD51</i> gena u naslednom karcinomu dojke, sistematskom karcinomu dojke i kontrolnoj grupi	85
4.6.2.	Ispitivanje asocijacije polimorfne varijante 5'UTR <i>RAD51</i> gena sa naslednim i sistematskim karcinomom dojke	86
4.6.3.	Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante 5'UTR <i>RAD51</i> gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora sistematskog uzorka karcinoma dojke.....	88
4.7.	POLIMORFIZAM Arg399Gln XRCC1 GENA.....	90
4.7.1.	Raspodela genotipova polimorfne varijanti kodona 399 <i>XRCC1</i> gena u naslednom karcinomu dojke, sistematskom karcinomu dojke i kontrolnoj grupi.....	91
4.7.2.	Ispitivanje asocijacije polimorfne varijante kodona 399 <i>XRCC1</i> gena sa naslednim i sistematskim karcinomom dojke.....	92
4.7.3.	Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante 5'UTR <i>RAD51</i> gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora sistematskog uzorka karcinoma dojke.....	94
4.8.	ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA TP53, RAD51 i XRCC1 GENA KAO PROGNOŠTIČKIH FAKTORA U KARCINOMU DOJKE	96
5.	DISKUSIJA	97
5.1.	ISPITIVANJE VELIKIH GENSKIH REARANŽMANA U BRCA1 i BRCA2 GENIMA	98
5.2.	TP53 i KARCINOM DOJKE	102
5.2.1.	<i>TP53</i> mutacije i rani karcinom dojke	102
5.2.2.	Polimorfizam Arg72Pro <i>TP53</i> gena i rizik za karcinom dojke	105
5.2.3.	Povezanost Arg72Pro polimorfizma <i>TP53</i> gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora.....	107
5.3.	CHEK2 i KARCINOM DOJKE	108
5.3.1.	<i>CHEK2</i> 1100delC	109

5.3.2.	<i>CHEK2</i> Del5395.....	110
5.4.	<i>RAD51C</i> , <i>RAD51</i> i KARCINOM DOJKE	112
5.4.1.	<i>RAD51</i> 135G>C polimorfizam i rizik za karcinom dojke.....	115
5.4.2.	Povezanost 135G>C polimorfizma <i>RAD51</i> gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora.....	117
5.5.	<i>NBS1</i> i KARCINOM DOJKE	119
5.6.	<i>XRCC1</i> i KARCINOM DOJKE	122
5.6.1.	<i>XRCC1</i> Arg399Gln polimorfizam i rizik za karcinom dojke.....	123
5.6.2.	Povezanost Arg399Gln polimorfizma <i>XRCC1</i> gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora.....	127
5.7.	POLIMORFIZMI TP53, <i>RAD51</i> i <i>XRCC1</i> GENA KAO PROGNOŠTIČKI MARKERI KARCINOMA DOJKE.....	128
5.8.	NEDOSTAJUĆA HERITABILNOST	130
6.	ZAKLJUČCI.....	134
7.	LITERATURA.....	137
8.	BIOGRAFIJA AUTORA.....	150

1. UVOD

1.1. KANCER

Ćelije kancera krše osnovna pravila po kojima je višećelijski organizam izgrađen i koja ga održavaju u funkcionalnom stanju. Za razliku od samostalnih, jednoćelijskih organizama, pojedinačne ćelije višećelijskog organizma su upućene na međusobnu saradnju. U cilju koordinisanja njihovog ponašanja, ćelije šalju, primaju i obradjuju setove signala koji im govore kako da deluju da bi održali kompleksnu strukturu kao što je višećelijski organizam. U skladu sa njima se svaka ćelija dalje i ponaša: diferencira se, deli se, ili umire ukoliko je to neophodno za dobrobit organizma. Nasledne molekularne promene (mutacije) koje narušavaju ovu harmoniju znače opasnost za ceo sistem. U ljudskom telu, u kome ima više od 10^{14} ćelija, milijarde ćelija svakodnevno doživljavaju mutacije koje bi potencijalno mogle narušiti stabilnost organizma. U najnepovoljnijem slučaju, one mogu obezbediti ćeliji sposobnost da se deli intenzivnije od svojih suseda, i dati joj mogućnost da postane osnivač rastućih klonova izmenjene ćelije. Ponavljajući ciklusi mutacije, kompeticije i favorizovanja ćelija koje se brže dele, dovode do kancera. Kancer je bolest u kojoj individualni klonovi izmenjenih ćelija počinju razvoj na račun susednih ćelija, ali na kraju završe uništavajući celokupan organizam. Početak razvoja kancera u organizmu se naziva onkogeneza. Postoje mnogi genetički faktori koji leže u osnovi onkogeneze: spontane promene (npr. spontane genske ili hromozomske mutacije), izlaganje mutagenima, zračenju ili delovanju virusa koji indukuju kancer (onkogeni virusi). Bitnu ulogu igra i nasledna predispozicija za razvoj kancera, odnosno, mutacije koje se prenose preko germinativnih ćelija.

Ćelije kancera su definisane dvema osobinama: (1) one i njihove ćelije se dele nezavisno od pravila i ograničenja kojima podležu normalne ćelije i (2) imaju sposobnost da vrše invaziju i kolonizaciju prostora rezervisanih za druge ćelije. Kombinacija ovih aktivnosti čini kancer opasnim po život jedinke. Izolovana, izmenjena, ćelija koja se ne umnožava u većoj meri nego njena susedna ćelija, neće uzrokovati značajniju štetu koliko

god loše karakteristike da ima, sve dok ne počne nekontrolisano da se deli. U tom slučaju nastaje tumor ili neoplazma - nekontrolisana, rastuća masa izmenjenih ćelija. Sve dok neoplastične ćelije ostaju grupisane zajedno u jednoj celini, za tumor se kaže da je benignan i u ovom stadijumu se lako može hirurški ukloniti. Tumor postaje kancer onda kada stiče malignu sposobnost, odnosno kada vrši invaziju na okolna tkiva. Invazivnost i metastatičnost ukazuju na sposobnost raskidanja međućelijskih veza, ulazak u krvotok ili limfotok, i formiranje sekundarnih tumora u drugim delovima tela - metastaza.

Kanceri se klasifikuju na osnovu tkiva i tipa ćelije od koje potiču. Karcinomi nastaju od epitelnih ćelija, sarkomi od ćelija vezivnog tkiva, leukemije od ćelija hematopoetskog sistema, a postoje i kanceri koji vode poreklo od ćelija nervnog sistema. Oko 90% kancera kod čoveka su karcinomi, verovatno zbog toga što je većina ćelija koje imaju sposobnost proliferacije poreklom iz epitela.

1.2. NASLEDNA PREDISPOZICIJA ZA KANCER

Veliki broj mutacija u genima (promena nukleotidne sekvence) se javlja samo u tumorima, i za njih kažemo da su somatske. Sa druge strane, genske mutacije kod naslednih kancera se javljaju u germinativnim ćelijama, i prisutne su u svakoj ćeliji u organizmu. Iako su za nastanak i razvoj kancera kod nosilaca mutacija u germinativnim ćelijama najčešće neophodne i druge somatske promene, prisustvo germinativnih mutacija ubrzava akumuliranje promena i nastanak maligniteta. Osobe sa germinativnim mutacijama u određenim genima, ne samo da imaju povećan rizik za razvoj bolesti, nego je i verovatnije da će oboleti u ranijem životnom dobu, kao i da će oboleti od multiplih primarnih tumora. Stoga, ukoliko se u porodici primeti veliki broj slučajeva obolelih od karcinoma u mlađem životnom dobu, kao i pojava multiplih primarnih tumora, trebalo bi posumnjati na postojanje naslednog kancerskog sindroma. Međutim, nekada je teško prepoznati nasledni kancer u porodicama zbog nepoznate porodične istorije, nedovoljne medicinske dokumentacije, ili nekompletne penetrabilnosti mutacija koje su odgovorne za razvoj bolesti. Germinativne mutacije, pored toga što se nasleduju, mogu nastati sponatno i tada

se nazivaju *de novo* mutacije. Takođe, sporadični karcinomi učestalih oblika kao što su karcinom dojke ili debelog creva, mogu nastati i kod osoba koje ne nose germinativne mutacije, što dodatno otežava uspostavljanje razlike između pravih naslednih kancerskih sindroma i slučajnog porodičnog nakupljanja bolesti. Verovatnoća da osoba koja nosi germinativnu mutaciju oboli od karcinoma zavisi od više faktora, kao što je na primer tip alela koji je nasledjen, ali i od modifikatorskog efekta drugih genetičkih i epigenetičkih faktora. Lokusna i alelska heterogenost stoga najčešće otežavaju tumačenje rezultata populacionih studija kancera. Egzogeni faktori kao što su način ishrane, način života, izloženost štetnim faktorima spoljašnje sredine, kao i endogeni faktori (faktori rasta, hormoni), mogu doprineti povećanju rizika za oboljevanje. Međutim, činjenica da srodne jedinice u porodicama najčešće dele i zajedničku sredinu, otežava prepoznavanje doprinosa nasledne, genetičke komponente u nastanku kancera.

1.2.1. Genetička osnova kancera

Do danas je otkriveno preko 100 gena koji su najčešće mutirani u humanim kancerima. Svi ovi geni čine grupu „kancer-kritičnih“ gena što znači da njihove mutacije doprinose nastanku bolesti. Oni su podeljeni u dve velike grupe u zavisnosti od toga da li rizik za razvoj bolesti nastaje usled povećane, ili usled smanjene aktivnosti genskog produkta. Geni prve grupe, kod kojih aktivirajuće mutacije vode ćeliju u nastanak kancera nazivaju se proto-onkogeni, a njihove mutirane forme povećane aktivnosti nazivaju se onkogeni. Geni druge grupe, kod kojih mutacije koje vode gubitku ili smanjenju funkcije uzrokuju kancerogenezu, nazivaju se tumor supresorski geni.

1.2.1.1. Onkogeni

Proto-onkogeni su visoko konzervirani tokom evolucije i prisutni su u brojnim vrstama, što ukazuje na značajnost bioloških funkcija proteina koje kodiraju. Proto-onkogeni su uključeni u tri glavna procesa prenosa signala u ćeliji. Prvi se odnosi na

fosforilaciju serinskih, treoninskih i tirozinskih ostataka proteina transferom fosfatne grupe sa ATP-a (eng. *Adenosine Triphosphate*). Drugu grupu čine *ras* proto-onkogeni koji su GTP-aze (eng. *Guanosine Triphosphate*), i treću grupu čine geni čiji su proteini smešteni u jedru, i koji kontrolišu progresiju kroz ćelijski ciklus, replikaciju DNK i ekspresiju gena. U onkogene spadaju: faktori rasta (npr. *v-sis*), receptori faktora rasta (npr. *c-erb-B*), faktori signalne transdukcije (npr. *ras*, *raf*), jedarni proteini koji se vezuju za DNK (npr. *fos*, *jun*, *erb-A*) i faktori regulacije ćelijskog ciklusa (npr. *c-myc*). U normalnim ćelijama, ekspresija proto-onkogeni je strogo regulisana, ali ukoliko dođe do mutacije, izmenjeni onkogeni vode neregulisanoj ćelijskoj deobi. Mutacije u jednoj kopiji proto-onkogeni imaju dominantan efekat i indukuju kancer. Do sada su poznata samo tri onkogeni koja su povezana sa naslednim sindromima kancera: *RET* u tireoidnom karcinomu, *CDK4* u melanomu i *MET* u papilarnom karcinomu bubrega.

1.2.1.2. Tumor supresorski geni

Ispitivanja naslednih kancera kod ljudi otkrila su postojanje tumor supresorskih gena. Oni imaju inhibitornu ulogu u ćelijskoj deobi i rastu kontrolišući ćelijsku deobu ili aktivirajući ćelijsku smrt. Ukoliko dođe do inaktivacije tumor supresorskog gena, počinje neregulisano umnožavanje ćelija. Prema Knudsonovoj hipotezi dva događaja (eng. *two-hit*), obe kopije tumor supresorskih gena moraju biti inaktivirane da bi došlo do nastanka kancera. Kod naslednih kancera se jedan mutirani alel nasledjuje, a gubitak funkcije drugog alela se dešava somatskim mutacijama. Druga mutacija je najčešće velika delecija koja se može vizuelizovati u odgovarajućem tumoru gubitkom heterozigotnosti (eng. *loss of heterozygosity*- LOH).

Prema biološkoj funkciji u ćeliji, tumor supresori se dele na: regulatore ćelijskog ciklusa i proliferacije, transkripcione faktore, regulatore popravke grešaka u DNK i proteine uključene u interakcije između ćelija, kao i interakcije ćelija sa matriksom (npr. *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RB*). Postoje i tumor supresori kod kojih se genetička promena ne javlja u transformišućoj populaciji ćelija već u susednim stromalnim ćelijama, koje promovišu malignitet svojih suseda usled narušene normalne komunikacije između njih.

Otkriveno je više od 40 tumor supresorskih gena u kojima inaktivirajuće mutacije uzrokuju nastanak većine naslednih kancerskih sindroma.

1.3. KARCINOM DOJKE

1.3.1. Epidemiologija

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest kod žena sa udelom 23% od svih kancera. U 2002. godini je procenjeno oko 1,15 miliona novih slučajeva (Parkin i Fernandez, 2006), dok je taj broj do 2008. porastao do 1,4 miliona. Više od polovine ovih slučajeva se otkriva u razvijenim zemljama: u Evropi čini 27,3% od svih maligniteta kod žena, a u Severnoj Americi 31,3%. Incidenca je nešto manja u istočnoj Evropi, Južnoj Americi, Južnoj Africi i zapadnoj Aziji, ali je i dalje najučestaliji karcinom kod žena čak i u ovim regionima. Njegova učestalost je niža u afričkim i azijskim zemljama, ali je i dalje najredji u zemljama centralne Afrike. Naizgled veća zastupljenost karcinoma dojke u razvijenim zemljama posledica je napretka i dostupnosti novih tehnologija za dijagnostikovanje ove bolesti. Stoga, aktuelna epidemiološka slika ne pokazuje realnu distribuciju karcinoma dojke u svetu jer, usled nedostatka adekvatne opreme, veliki broj slučajeva ostaje neotkriven. Iako se karcinom dojke kao uzročnik smrtnosti nalazi na petom mestu, ipak je vodeći uzrok smrtnosti prouzrokovanih kancerom kod žena (oko 411 000 smrti na godišnjem nivou čine 14% smrti usled nekog tipa kancera). Nerazvijena infrastruktura i slaba dostupnost redovnim pregledima u slabo razvijenim zemljama vodi i kasnom otkrivanju karcinoma dojke i dijagnozi kada je bolest već uznapredovala. S obzirom da se bolest kasno otkriva, stopa mortaliteta je često mnogo viša u slabije razvijenim zemljama. Tome doprinosi činjenica da je karcinom dojke, usled brojnih kulturoloških fenomena, i danas razlog za stigmatizaciju i odbacivanje žena iz društva u određenim sredinama, pa se isti krije kao sramotna tajna sve do stadijuma kada ga je nemoguće izlečiti (Coughlin i Ekwueme, 2009).

Od kraja dvadesetog veka, zahvaljujući ogromnom napretku u ranoj detekciji i lečenju karcinoma dojke, zabeležen je postepen, ali stabilan pad mortaliteta uzrokovan ovom bolešću (den Hollander i sar., 2013). Bez obzira na to, u Americi će ove godine od karcinoma dojke umreti oko 40 000 žena (Siegel i sar., 2013), a u Evropi se porast mortaliteta meri čak i u onim zemljama u kojima je incidenca bila relativno niska u prošlosti (Rusija, Estonija, Rumunija, Madjarska) (Parkin i Fernandez, 2006). U Srbiji, na godišnjem nivou, od karcinoma dojke oboli 4500 žena od kojih se više od trećine dijagnostikuje na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Oko 200 pacijentkinja dijagnostikovanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije se javi sa već uznapređovalom metastatskom bolešću.

1.3.2. Faktori rizika za razvoj karcinoma dojke

Pored ženskog pola, starosna dob je jedan od najznačajnijih faktora rizika za razvoj karcinoma dojke. Incidenca ove bolesti i stopa smrtnosti se povećava sa starošću (95% novih slučajeva i 97% smrti usled ove bolesti se dešava kod osoba starijih od 40 godina).

15-20% žena koje obole od karcinoma dojke ima porodičnu istoriju ove bolesti. Mera porodičnog nakupljanja bolesti izražena je kroz relativni rizik za oboljevanje (RR) koji se definiše kao odnos rizika osobe koja ima obolelog najbližeg srodnika, u odnosu na rizik za opštu populaciju (Mavaddat i sar., 2010). Rizik se povećava sa povećanjem broja obolelih prvostepeni srodnika. Poredeći sa osobom koja nema istoriju bolesti u porodici, rizik se povećava do 2 puta ako postoji jedan oboleli blizak srodnik, do 3 puta sa dva obolela srodnika i skoro do 4 puta sa tri ili više obolelih srodnika. Ukoliko postoji veći broj obolelih u porodici, rizik se u ovom slučaju povećava i kod udaljenih srodnika. Rizik se povećava i ukoliko je srodnik oboleo u mladjem životnom dobu, pa je povećan i do 5 puta kod osobe mlađe od 40 godina čiji je srodnik u vreme dijagnoze imao manje od 40 godina. Porodična istorija karcinoma jajnika je takodje povezana sa rizikom za oboljevanje od karcinoma dojke. Rizik se povećava i nasledjenim mutacijama u određenim visoko penetrabilnim genima.

Velika gustina tkiva dojke (mamografska mera odnosa žlezdanog i masnog tkiva), hiperplazija tkiva, kao i visoke doze radijacije grudnog dela kao rezultat medicinskih procedura, takodje predstavljaju bitne faktore rizika. Razlike u reproduktivnim i hormonskim faktorima predstavljaju dodatne uzročnike koji doprinose varijaciji u učestalosti karcinoma dojke. Reproductivni faktori koji povećavaju rizik uključuju dugu menstrualnu istoriju (menstrualni ciklusi kreću ranije i/ili se završavaju kasnije u životu), neradjanje dece, upotrebu oralnih kontraceptiva i vreme prvog porodjaja posle 30. godine života. Prekomerna telesna težina, upotreba menopauzne hormonske terapije, fizička neaktivnost i alkoholizam, takodje se ubrajaju u potencijalne faktore koji doprinose povećanju rizika. Dojenje, umerena fizička aktivnost i zdrav način života su povezani sa smanjenjem rizika za oboljevanje od karcinoma dojke (Filipović i sar., 2009).

1.3.3. Histopatološke forme karcinoma dojke

Većina maligniteta dojke su karcinomi epitelnih ćelija koje oblažu luminalnu stranu kanalića i lobulusa dojke. Ređi oblici maligniteta dojke potiču iz stromalnih ćelija koje okružuju epitelne žlezde. Skoro 80% svih tumora dojke pripada karcinomu. Sarkomi su retki, sa učestalošću od 1% svih malignih tumora dojke, a preostali tumori su benigni (Filipović i sar., 2009).

Karcinom dojke se klasifikuje na osnovu histogeneze (duktalni, lobularni, acinusni), morfoloških karakteristika (koloidni, papilarni itd.), ili na osnovu svoje invazivnosti (invazivni, i neinvazivni - *in situ*) (Tabela 1).

Tabela 1. WHO (eng. *World Health Organization*) klasifikacija karcinoma dojke

Histološke podvrste	Incidenca
Neinvazivni karcinomi	
Intraduktalni karcinom (DCIS)	15%
Lobularni karcinom <i>in situ</i> (LCIS)	2%
Invazivni adenokarcinomi	
Invazivni duktalni karcinom (NOS)	60%
Invazivni lobularni karcinom	5-10%

Mucinozni (koloidni) karcinom	2-5%
Medularni karcinom	1-5%
Tubularni karcinom	2-5%
Papilarni karcinom	2-5%
Ostali tipovi	1-5%

Invazivni duktalni karcinom je najčešći oblik svih karcinoma dojke. On se precizno naziva invazivni duktalni karcinom koji nije drugačije specificiran (eng. *Not Otherwise Specified* - NOS). Radi se o heterogenoj skupini tumora koja uključuje sve invazivne karcinome bez određene morfologije i pripadnosti bilo kom tipu tumora. Invazivni lobularni karcinom dojke se javlja u svega 5 - 10% svih karcinoma dojke. Medularni karcinom dojke je relativno redak podtip duktalnog karcinoma sa učešćem od 3% svih invazivnih malignih tumora i 1% svih karcinoma dojke.

Ostali tipovi karcinoma dojke koji ne predstavljaju zasebne patološke vrste obuhvataju inflamatorni karcinom i *Paget* - ovu bolest bradavica. Termin inflamatorni karcinom se koristi za karcinome koji se odlikuju edemom, hiperemijom i izgledom dojke nalik kori pomorandže, usled brze infiltracije limfatika kože tumorskim ćelijama. U slučaju Pagetove bolesti, maligne ćelije se najčešće iz duktalnog karcinoma šire u polje između keratinocita - epidermotropni karcinom, zahvatajući kožu bradavice i areole.

1.3.3.1. TNM klasifikacija karcinoma dojke

Karcinom dojke podleže TNM kliničkoj klasifikaciji koja se bazira na veličini tumora (T), statusu regionalnih limfnih čvorova (N) i prisustvu udaljenih metastaza (M) (Tabela 2) (Singletary i sar., 2002).

Tabela 2. TNM klinička klasifikacija karcinoma dojke

Primarni tumor	
TX	Primarni tumor se ne može proceniti
T0	Nema znakova primarnog tumora
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Tumor \leq 2cm u najvećoj dimenziji

T2	Tumor > 2cm ali < 5cm
T3	Tumor> 5cm
T4	Tumor bilo koje veličine sa direktnom ekstenzijom u zid grudnog koša ili u kožu
Regionalni limfni čvorovi	
Nx	Ne mogu da se procene
N0	Nema regionalnih metastaza
N1	Metastaze u pokretne ipsilateralne aksilarne limfatike
N2	Metastaze u ipsilateralnim aksilarnim limfnim čvorovima fiksirane ili spojene, ili klinički evidentni ipsilateralni interni nodusi dojke u odsustvu klinički evidentnih aksilarnih limfonodalnih metastaza
N3	Metastaze u ipsilateralne intraklavikularne limfne noduse sa ili bez zahvatanja aksilarnih limfnih nodusa, ili u klinički evidentnim ipsilateralnim internim nodusima dojke i u prisustvu klinički evidentnih aksilarnih limfonodalnih metastaza; ili metastaze u ipsilateralne supraklavikularne limfne noduse sa ili bez aksilarnog ili zahvatanja internih limfatika dojke
Udaljene metastaze	
MX	Ne mogu se proceniti
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Prisutne udaljene metastaze

Pored kliničke klasifikacije, karcinom dojke podleže i patološkoj TNM klasifikaciji (pTNM) koja zahteva pregled primarnog karcinoma bez golim okom vidljivog tumora na marginama resekcije. Slučaj se može klasifikovati kao pT ako se na margini nalazi samo mikroskopski tumor. pT i pM kategorije odgovaraju T i M kategorijama. Resekcija i pregled bar donjih aksilarnih limfnih čvorova su neophodni za utvrđivanje pN statusa (Medjunarodna unija za borbu protiv raka, 2002).

1.3.3.2. Histološki stepen diferenciranosti tumora (gradus tumora)

Histološki gradus tumora se odnosi na to koliko tumorske ćelije liče na ćelije normalnog tkiva iz koga su nastale. Prilikom određivanja stepena diferenciranosti tumora posmatraju se sledeći parametri: formacije žlezdanih tubula i acinusa, pleomorfizam jedara

karcinomskih ćelija (nepravilnost u veličini, obliku i strukturi) i broj mitozu. Prema opšteprihvaćenoj preporuci *The American Joint Commission on Cancer (AJCC)* razlikuju se: dobro diferencirani tumori (gradus 1 - G1), umereno diferencirani tumori (gradus 2 - G2), slabo diferencirani tumori (gradus 3 - G3). Lošije prognoze se pripisuju visokogradusnim karcinomima.

1.3.3.3. Biološki markeri karcinoma dojke

Prognostički faktori određuju se iz tkiva tumora nakon biopsije ili operacije, a imaju za cilj procenu agresivnosti tumora i opšte prognoze bolesti. Neki od njih su i prediktivni faktori, kao na primer status estrogenih (ER) i progesteronskih (PR) receptora, jer se na osnovu njih vrši izbor adekvatne terapije.

Smatra se da je većina karcinoma dojke (70%) hormonski zavisna u svom rastu i samim tim senzitivna na tretman hormonima (Filipović i sar., 2009). Procenu hormonske senzitivnosti definiše status ER i PR. Cilj hormonske terapije kod osoba sa karcinomom dojke je zapravo da spreči stimulatívno delovanje estrogena na ćelije karcinoma dojke. Anti-estrogeno lečenje bazira se na uklanjanju izvora estrogena, na sprečavanju vezivanja estrogena za unutarćelijske ER, ili blokiranju aktivnosti enzima aromataze koja učestvuje u sintezi estrogena. Tamoksifen se smatra zlatnim standardom hormonske terapije kod karcinoma dojke čiji je rast zavisn od estrogena. Her2 je receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (eng. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). Her2 protein normalno se eksprimira u velikom broju humanih organa i tkiva i ima funkciju u regulaciji rasta, proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Visok nivo ekspresije proteina Her2 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke uglavnom je u pozitivnoj korelaciji sa visokim histološkim gradusom, niskim sadržajem steroidnih receptora, povećanim proliferativnim potencijalom, i pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, što ukazuje da je povećana ekspresija Her2 faktor loše prognoze. Neki karcinomi dojke poznati su kao trostruko negativni (eng. *triple – negative*) jer se odlikuju odsustvom receptora za estrogen i progesteron, kao i odsustvom Her2 receptora. Agresivnost tumorskog fenotipa, delimičan odgovor na hemioterapiju i trenutni nedostatak klinički validne ciljane terapije povezuju

ove karcinome sa lošom kliničkom prognozom. Indeks proliferacije je ključna karakteristika kancerskih ćelija koji se procenjuje imunohistohemijskom analizom jedarnog proteina Ki-67. Visok nivo ovog proteina korelira sa lošijom prognozom, ali i sa većim šansama za bolji klinički odgovor na hemioterapiju.

1.3.3.4. Patološke karakteristike *BRCA1/2* zavisnih karcinoma dojke

Za karcinome koji su povezani sa mutacijama u visoko penetrabilnom genu *BRCA1* (eng. *Breast Cancer Susceptibility Gene 1*) je primećeno da su lošije diferencirani (histološki gradus 3), imaju veći stepen jedarnih pleomorfizama kao i veći broj mitoza u odnosu na sporadične tumore (Lakhani i sar., 2002; Mangia i sar., 2011; Lalloo i Evans, 2012). Oko 75% *BRCA1* zavisnih karcinoma su po tipu invazivni duktalni, ali i atipični medularni karcinomi su češći kod *BRCA1* zavisnih tumora (13%) u odnosu na sporadične forme (3%) (Lalloo i Evans, 2012). Najupečatljivija karakteristika *BRCA1* vezanih karcinoma dojke (90% slučajeva) je nedostatak ekspresije steroidnog receptora za estrogen (ER) koji predstavlja jedan od najznačajnijih prognostičkih i prediktivnih markera (Mavaddat i sar., 2010; Mangia i sar., 2011). Pokazan je i nedostatak ekspresije receptora za progesteron (PR) kao i niža ušestalost Her2 ekspresije u poredjenju sa sporadičnim oblicima (Lakhani, 2002). Što se tiče proliferativnih markera, visoka ekspresija Ki-67, visoki mitotski indeks kao i *c-myc* amplifikacija takodje karakterišu *BRCA1* zavisne karcinome (Mangia i sar., 2011).

Patologija karcinoma dojke kod nosilaca mutacija u drugom visoko penetrabilnom genu u karcinomu dojke, *BRCA2* (eng. *Breast Cancer Susceptibility Gene 2*), nije toliko karakteristična kao kod *BRCA1*. *BRCA2* zavisni tumori su srednje ili nisko diferencirani karcinomi (histološki gradusi 2 i 3) bez povećanja jedarnih plejomorfizama, i nemaju obavezno povećan mitotski status (Lalloo i Evans, 2012). Lobularni karcinom kao i duktalni karcinom *in situ* (DCIS) su prijavljeni kao češći kod *BRCA2* zavisnih tumora u odnosu na *BRCA1* zavisne. Što se tiče statusa steroidnih receptora, *BRCA2* zavisni tumori imaju sličan nivo ekspresije ER i PR kao i sporadični oblici (Lakhani i sar., 2002; Mangia i

sar., 2011). Povećana Her2 ekspresija je retka kod *BRCA2* vezanih karcinoma sa učestalošću koja varira od 0% do 3,7% (Mangia i sar., 2011).

1.3.3.5. Molekularni podtipovi karcinoma dojke

Skorašnje studije profilisanja genske ekspresije u karcinomu dojke su identifikovale dodatne specifične podtipove sa karakterističnim kliničkim, biološkim i terapijskim implikacijama. Ovakve analize su rezultovale u identifikaciji nekoliko podtipova karcinoma dojke: luminalni (A i B), onaj koji liči na normalno tkivo dojke (eng. *normal-like*), Her2 prekomerno – eksprimirajući, i podtip sličan bazalnom karcinomu (eng. *basal-like*) (Schnitt, 2010; Mangia i sar., 2011). Svaki od ovih podtipova eksprimira različite setove gena, dok poslednja dva imaju agresivniji klinički tok i lošiji ishod. Za luminalne tipove je karakteristična ekspresija gena koji kodiraju hormonske receptore, i oni su u 70% slučajeva invazivni karcinomi. Her2 tip karakteriše niska ER ekspresija, u 15% slučajeva su invazivni karcinomi, a često su većeg histološkog gradusa sa lošijom prognozom. Mutacije u *BRCA1* genu su često pronadjene kod podtipa sličnog bazalnom karcinomu.

1.4. NASLEDNI KARCINOM DOJKE I JAJNIKA

Iako se većina karcinoma dojke javlja sporadično, bez porodičnog nakupljanja, ipak postoji odredjen broj slučajeva (5-10%) koji ima izraženu naslednu komponentu, i tada govorimo o naslednom karcinomu dojke (Roy i sar., 2011; Lalloo i Evans, 2012). Najčešći oblik ovog oboljenja je pojava većeg broja slučajeva karcinoma dojke i karcinoma jajnika u istoj porodici (eng. *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*- HBOC).

Pretpostavlja se da se ~5% ukupnog karcinoma dojke može objasniti mutacijama u visoko penetrabilnim genima *BRCA1* i *BRCA2* (Ripperger i sar., 2009). Posmatrane na nivou naslednog karcinoma dojke, mutacije u *BRCA1/2* genima su odgovorne za 20-40% slučajeva i povećavaju rizik za oboljevanje do čak 85% (Ripperger i sar., 2009; Lalloo i Evans, 2012). Pored karcinoma dojke u okviru HBOC, postoje i drugi nasledni kancerski

sindromi u okviru kojih se karcinom dojke javlja sa velikom učestalošću, a kod kojih su mutacije u drugim genima odgovorne za povećanje rizika (*Li Fraumeni, Peutz-Jeghers, Cowden, Nimejgen Breakage Sindrom*).

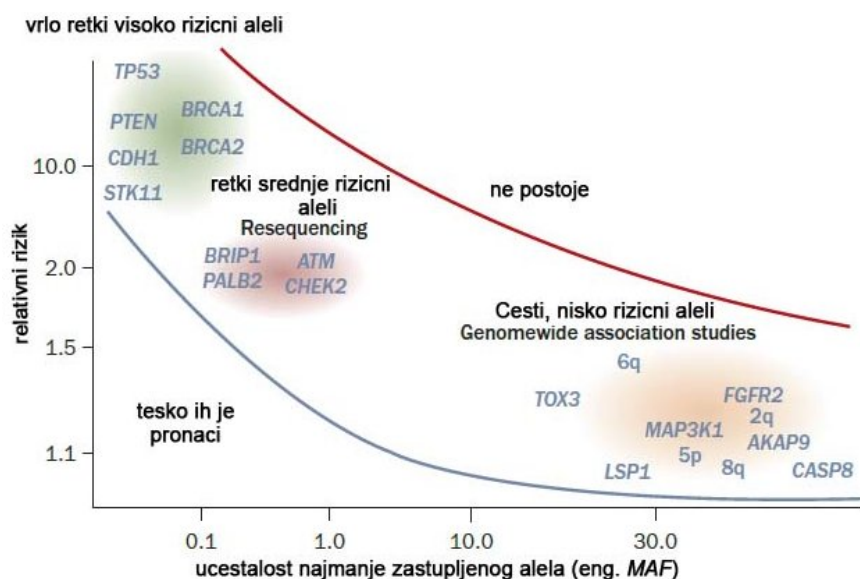
1.5. POLIGENI MODEL NASLEDNOG KARCINOMA DOJKE

BRCA1 i *BRCA2* su najčešće mutirani geni u naslednom karcinomu dojke i jajnika. Sve od njihovog otkrića devedesetih godina prošlog veka, ovi geni su u centru istraživanja genetičke osnove naslednog karcinoma dojke (Claus i sar., 1991; Nathanson i sar., 2001; Roy i sar., 2011). Iako se u početku verovalo da će mutacije u *BRCA1/2* genima objasniti celokupnu genetičku predispoziciju za nastanak i razvoj ove bolesti, ipak je činjenica da su mutacije u njima retki događaji čak i kod visokorizičnih porodica, podstakla dalja istraživanja ostatka nasledne predispozicije za karcinom dojke. Veliki napori su učinjeni u cilju pronalaska potencijalnog trećeg visoko penetrabilnog gena (*BRCA3*), koji bi bio odgovoran za onaj deo nasledne predispozicije koju *BRCA1/2* geni nisu uspeali da objasne (Ripperger i sar., 2009; Meindl i sar., 2011; Apostolou i Fostira., 2013). S obzirom da takav gen nakon intenzivnog istraživanja još uvek nije pronađen, postalo je jasno da porodično nakupljanje karcinoma dojke i jajnika ipak ne može biti objašnjeno na jednostavan način, uz pomoć nekoliko visoko penetrabilnih gena. Po novom, poligenom modelu genetičke osnove naslednog karcinoma dojke, pored već pomenutih visoko penetrabilnih alela, postoji i veliki broj srednje i nisko penetrabilnih alela, koji zajedno doprinose riziku za oboljevanje. Dakle, veliki broj učestalih, nisko rizičnih varijanti ima multiplikativan efekat u određivanju ukupnog rizika za razvoj bolesti. Razvojem novih tehnologija sekvenciranja genoma i paralelnog testiranja brojnih gena, otkriven je niz drugih gena koji su povezani sa karcinomom dojke, što je podržalo teoriju poligenog modela. Konkretni efekat kao i opseg odgovornosti svih otkrivenih varijanti se i danas ispituje.

Sve alelske varijante odgovorne za karcinom dojke, tj. geni u kojima se one nalaze, se mogu podeliti u tri grupe. Prvu grupu čine visoko penetrabilni geni (*BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, STK11* i *CDHI*) čije su mutacije u opštoj populaciji vrlo retke (<1%), ali su

odgovorne za veliko povećanje rizika za oboljevanje. Relativni rizik kod nosilaca mutacija u ovim genima se, u odnosu na osobe koje nemaju mutaciju, povećava od 5 do čak 20 puta (Slika 1) (Mavaddat i sar., 2010; Apostolou i Fostira, 2013).

Drugu grupu čine srednje penetrabilni geni (*ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51*, *RAD51C*, *XRCC1*, *BRIP1*, *PALB2*...) sa retkim alelima (~1%), čije mutacije daju relativni rizik za oboljevanje između 1,5 i 5. Treću grupu čine geni i hromozomski regioni (*MAP3K1*, *FGFR2*, *LSP1*, *HI9*...) čije mutacije doprinose malom povećanju rizika za oboljevanje od karcinoma dojke (relativni rizik manji od 1,5) (Mavaddat i sar., 2010; Apostolou i Fostira, 2013). Promene u nisko penetrabilnim genima su po tipu najčešće polimorfizmi nukleotidne sekvence (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*- SNP) čija je učestalost velika (i do 40%), a pojedinačni efekat na rizik za karcinom dojke nizak. Većina nisko penetrabilnih alela i genskih lokusa su pronadjeni velikim genomskim studijama asocijacija (eng. *Genome Wide Association Studies*- GWAS) (Slika 1).



Slika 1. Relativni rizik germinativnih mutacija koje doprinose riziku za karcinom dojke u odnosu na učestalost najmanje zastupljenog alela (eng. *Minor Allele Frequency*- MAF).

Preuzeto i prilagodjeno iz Harris i McCormick, 2010.

1.5.1. Visoko penetrabilni geni u karcinomu dojke

U grupu visoko penetrabilnih gena spadaju oni čije su mutacije povezane sa visokim rizikom za oboljevanje (Mavaddat i sar., 2010; Collins i Politopoulos, 2011; Lalloo i Evans, 2012). Mnogi od ovih gena su otkriveni genetičkim analizama vezanosti (eng. *genetic linkage analysis*) u pažljivo odabranim visokorizičnim porodicama. Upravo su ovakve studije devedestih godina dvadesetog veka dovele do okrića da mutacije u tumor supresorskim genima *BRCA1* i *BRCA2* vode velikom povećanju rizika za oboljevanje od karcinoma dojke, i svrstale ova dva gena u visoko penetrabilne. Nasledni karcinom dojke i jajnika izazvan mutacijama u *BRCA1/2* genima predstavlja najučestalije autozomno dominantno oboljenje povezano sa visokim rizikom za karcinom dojke (50-80% životni rizik) (Apostolou i Fostira, 2013). Iako imaju visoku penetrabilnost, mutacije u ovim genima su retke, sa kombinovanom učestalošću od samo ~0,4% (Lalloo i Evans, 2012).

Pored naslednog karcinoma dojke i jajnika, postoji i nekoliko retkih kancerskih sindroma koji karcinom dojke uključuju u fenotip bolesti, i u okviru kojih je rizik za karcinom dojke povećan. Mutacije u drugim visoko penetrabilnim genima su povezane upravo sa razvojem ovih sindroma, a u okviru njih, i sa povećanjem rizika za razvoj karcinoma dojke. Mutacije u tumor supresornom *TP53* genu su odgovorne za nastanak *Li-Fraumeni* sindroma (LFS), kod koga je karcinom dojke samo jedna od brojnih neoplazija koje se javljaju (sarkomi mekih tkiva, leukemije, tumori mozga) (Tabela 3) (Ripperger i sar., 2009). Iako LFS ima mali udeo u ukupnom karcinomu dojke (~0,1%), nosioci mutacija u *TP53* genu imaju čak do 6 puta povećan rizik za razvoj ranog karcinoma dojke (pre 45 godine života), a ukupni životni rizik za oboljevanje od karcinoma dojke čak 56-90% (Apostolou i Fostira, 2013). Povećan rizik za karcinom dojke javlja se i kod osoba sa *Peutz-Jeghers* sindromom uzrokovanim heterozigotnim mutacijama u *STK11* genu (32-54%) (Ripperger i sar., 2009). Mutacije u *PTEN* genu vode nastanku *Cowden* sindroma i povećanju rizika za karcinom dojke 30-50% do 70. godine života. *CDHI* gen se takodje ubraja u visoko penetrabilne gene čije mutacije vode nastanku naslednog difuznog gastričnog kancera, a u okviru njega povećavaju rizik za karcinom dojke do 60%. Čak i bez istorije gastričnog kancera, mutacije u *CDHI* genu se povezuju sa lobularnim karcinomom

dojke (Ripperger i sar., 2009). Bez obzira na visok rizik povezan sa visoko penetrabilnim genima, procenjeno je da mutacije u njima doprinose relativno malom ukupnom procentu porodičnog rizika (oko 20%) (Thompson i Easton, 2004; Hollestelle i sar., 2010).

Tabela 3. Visoko penetrabilni geni u karcinomu dojke

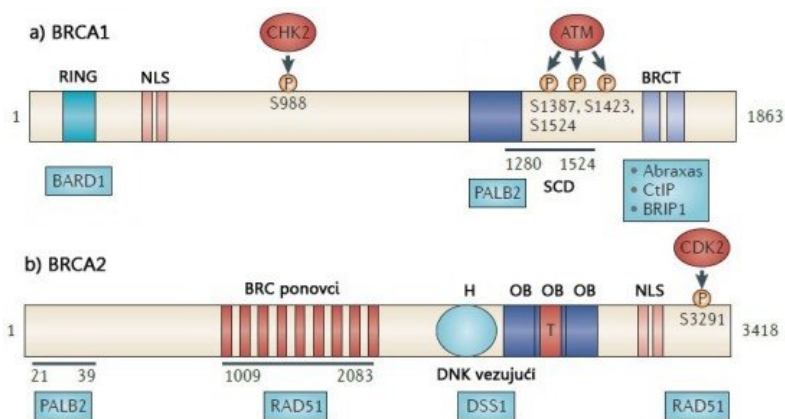
Sindrom	Gen (hromozomska lokacija)	Neoplazma	Životni rizik za karcinom dojke
Nasledni karcinom dojke i jajnika (HBOC)	<i>BRCA1</i> (17q21)	Ženski karcinom dojke, karcinom jajnika	40-80%
	<i>BRCA2</i> (13q12)	Muški i ženski karcinom dojke, karcinom jajnika, karcinom pankreasa, prostate	20-85%
<i>Li-Fraumeni</i>	<i>TP53</i> (17p13.1)	Karcinom dojke, sarkomi, leukemije, tumori mozga, adrenokortikalni karcinomi, karcinom pluća	56-90%
<i>Cowden sindrom</i>	<i>PTEN</i> (10q23.3)	Karcinom dojke, tiroidee, endometrijuma	25-50%
<i>Peutz-Jeghers</i>	<i>STK11</i> (19p13.3)	Karcinom dojke, jajnika, cerviksa, uterusa, testisa, tankog i debelog creva	32-54%
Nasledni gastrointestinalni kancer	<i>CDHI</i> (16q22.1)	Difuzni gastrični kancer, lobularni karcinom dojke, kolorektalni karcinom	60%

1.5.1.1. BRCA1 i BRCA2, gradnja i funkcija

BRCA1 je gen koji se nalazi na 17. hromozomu (17q21) i gradjen je od 24 egzona od kojih 22 kodiraju jedarni fosfoprotein veličine 1863 amino kiselina (ak) (Weberpals i sar., 2008). *BRCA1* protein ima visoko konzervirani amino-terminalni, cink vezujući domen (*ring finger*) koji ima ubivitin ligaznu aktivnost, kao i dva *BRCA1* C terminalna domena (*BRCT*) koji imaju ulogu u transkripcionoj aktivaciji. Ovakvi C terminalni domeni su karakteristika proteina koji imaju ulogu u popravci grešaka u DNK (Nathanson i sar., 2001). Najveći egzon *BRCA1* gena je 11. egzon koji kodira deo proteina u kome se nalaze

dva signala za lokalizaciju u jedru, kao i region odgovoran za vezivanje sa DNK (Slika 2). Na slici se vide i mesta interakcije sa drugim proteinima kao i mesta fosforilacije od strane ATM (eng. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) i ATR (eng. *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*) kinaza u odgovoru na oštećenje u DNK na mestu koji se označava kao SQ/TQ region (SCD).

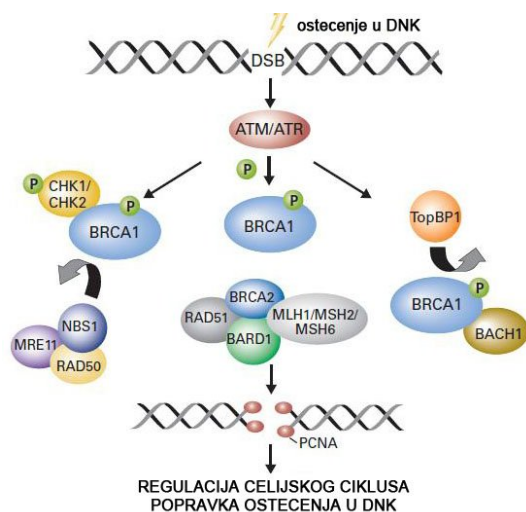
Gen *BRCA2* je gradjen od 27 egzona od kojih je 26 kodirajućih. Nalazi se na 13. hromozomu (13q12) i kodira protein veličine 3418 amino kiselina (Slika 2) (Nathanson i sar., 2001; Narod i Foulkes, 2004). Središnji region ovog proteina sadrži 8 BRC motiva koji su neophodni za vezivanje za RAD51 protein. Ovaj region se obeležava kao OCCR (eng. *Ovarian Cancer Cluster Region*) jer su mutacije u njemu asocirane sa povećanom penetrabilnošću u karcinomu jajnika. DNK vezujući region *BRCA2* proteina sadrži helikazni domen (H), tri oligonukleotidna vezujuća domena (OB) i T domen (eng. *tower domain*) koji mu olakšava vezivanje za jednolančane i dvolančane DNK lance (Roy i sar., 2011). Na C kraju proteina nalaze se signali za lokalizaciju u jedru kao i mesto fosforilacije ciklin zavisnih kinaza.



Slika 2. Funkcionalni domeni BRCA1 i BRCA2 proteina. Preuzeto i prilagodjeno iz Roy i sar., 2011.

Oba BRCA proteina su uključena u proces homologe rekombinacije (HR), mehanizmu koji ispravlja brojna oštećenja u DNK od kojih su najznačajniji dvolančani prekidi (eng. *Double Strand Breaks*- DSBs) (Krejci i sar., 2012). HR dominira za vreme S

i G2 faze ćelijskog ciklusa kada je neoštećeni homologi lanac dostupan kao matrica za popravku oštećenog lanca (Weberpals i sar., 2008). HR zahteva pozicioniranje homologe DNK matrice (sestrinska hromatida ili homologi hromozom) u blizini DNK oštećenja, na osnovu koga se sintetiše deo koji nedostaje. Oštećenje u DNK predstavlja signal za prebacivanje kompleksa BRCA1 i RAD51 proteina iz subjedarnih grupacija u oblast oštećenog regiona. Za vreme ovog procesa, BRCA1 se fosforiliše od strane ATM, ATR i CHEK2 (eng. *Checkpoint Kinase 2*) protein kinaza, koje su aktivirane oštećenjem u DNK. Priroda interakcije BRCA1 i RAD51 proteina je nepoznata, a za BRCA2 se zna da može da interaguje direktno sa RAD51, bilo preko svojih centralnih BRC domena, bilo preko regiona na C terminusu proteina (Narod i Foulkes, 2004). Fosforilisani BRCA1 protein dalje prenosi signale oštećenja i reguliše nizvodni ćelijski odgovor (Slika 3) (Weberpals i sar., 2008). BRCA2 i RAD51 proteini čine efektni kompleks koji inicira samu popravku oštećenja, a BRCA2 je odgovoran za dovodjenje RAD51 do mesta oštećenja. Ćelije koje nemaju normalnu funkciju BRCA1 ili BRCA2 proteina su izrazito osetljive na agense koji uzrokuju DSBs u DNK. U ovakvim ćelijama, novonastala oštećenja se ispravljaju mehanizmom koji je podložan greškama, a zove se ne-homologo spajanje krajeva (eng. *Non Homologous End Joining- NHEJ*). Ovako nastale greške uzrokuju genomsku



nestabilnost za koju se veruje da predstavlja ključni faktor u kancerogenezi (Narod i Foulkes, 2004). Pored HR, postoje podaci da je BRCA1 uključen i u proces popravke jednolančanih prekida isecanjem nukleotida (eng. *Nucleotide Excision Repair- NER*).

Slika 3. Proteini koji formiraju komplekse sa BRCA1 u odgovoru na oštećenje u DNK. Preuzeto i prilagodjeno iz Weberpals i sar., 2008.

Kada nastane oštećenje u DNK, ćelija mora da zaustavi ćelijski ciklus i odloži ćelijsku deobu da bi popravila nastalo oštećenje, kako se ono ne bi prenelo na sledeću generaciju ćelija. BRCA1-BARD1 (eng. *BRCA1-Associated RING Domain*) kompleks reguliše ćelijski ciklus aktivacijom kontrolnih tačaka u G1/S, S i G2/M fazama. Mehanizam delovanja ovog kompleksa još uvek nije poznat, ali se zna da G1/S tačka zahteva fosforilaciju BRCA1 proteina od strane ATM i ATR kinaza, i fosforilaciju TP53 proteina koji je neophodan za aktivaciju ciklin zavisnih kinaza (CDK) (Roy i sar., 2011). Za kontrolnu tačku u S fazi ciklusa, BRCA1-BRIP1-TOPBP1 kompleks je neophodan u odgovoru na greške koje nastanu replikacijom. BRCA1 je neophodan i u kompleksima koji reaguju na greške nastale jonizujućim zračenjem, i zaustavljaju ciklus u G2/M fazi ciklusa.

BRCA1 i BARD1 proteini formiraju kompleks koji učestvuje u procesu ubikvitinacije, obeležavanja proteina koje je potrebno degradovati. Interesantno je opažanje da se BRCA1 posredovana ubikvitinacija dešava u odgovoru na replikacioni stres povezujući ovu funkciju BRCA1 proteina sa odgovorom na DNK oštećenja (Narod i Foulkes, 2004).

Nekoliko više-subjediničnih kompleksa, uključujući i BASC (eng. *BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex*) koji je gradjen od BLM, MSH2-MSH6 i MRE11-RAD50-NBS1, učestvuju u procesu remodelovanja hromatina koji se vrši u regionu oštećene DNK, prvenstveno da olakša proces popravke grešaka. BRCA1 je član i kompleksa koji sadrži hromatin remodelujuće proteine SWI (eng. *SWItch*) i SNF (eng. *Sucrose Non Fermentable*). Sposobnost BRCA1 da koaktivira TP53-zavisnu stimulaciju p21 i p53 promotora zavisi od asocijacije sa SWI/SNF kompleksom. BRCA1 može da funkcioniše i kao histon deacetilaza i da direktno interaguje i sa drugim proteinima koji učestvuju u remodelovanju hromatina.

1.5.1.2. Mutacije u *BRCA1* i *BRCA2* genima

Germinativne mutacije u oba *BRCA* gena su moguće u celim kodirajućim regionima i ne pokazuju tendenciju grupisanja u pojedinim delovima. Najčešće su po tipu male insercije ili delecije koje kao rezultat daju pomak okvira čitanja (eng. *frameshift*) i vode ka

sintezi nefunkcionalnog proteina (Narod i Foulkes, 2004). Česte su i *nonsense* mutacije koje vode prevremenom prekidu sinteze proteina i nastanku najčešće nefunkcionalnih, kratkih peptida. Veliki broj mutacija u *BRCA* genima čine mutacije *missense* tipa koje menjaju samo jednu amino kiselinu u proteinu, ali ostatak proteina ostaje intaktan. Najčešće su to neutralne polimorfne varijante koje nemaju efekat na protein, ali nekada mogu i da nuđu normalnu funkciju. Do danas je prijavljeno više od 300 *missense* mutacija u BIC-u (eng. *Breast Cancer Information Core*). Još od njihovog otkrića u *BRCA* genima, postojale su poteškoće u interpretiranju efekta *missense* mutacija. Utvrđivanje rizika za oboljevanje od karcinoma dojke kod osoba koje nose ovakve, neklasifikovane varijante, i dalje predstavlja izazov za genetičare. Konstantni napori se ulažu u razvoj adekvatnih testova za procenu štetnosti ovakvih promena.

Iako je pronadjeno više od 100 jedinstvenih štetnih mutacija, u određenim populacijama su neke od njih učestalije. Ovo je posledica efekta osnivača (eng. *founder effect*), kada retke mutacije rastu u učestalosti u malim ili izolovanim populacijama i etničkim grupama nastalim od malog broja jedinki. Tada se govori o postojanju osnivačkih mutacija (eng. *founder*). Na primer, kod populacije Aškenazi Jevreja, dve mutacije u *BRCA1* genu c.68_69delAG i c.5266dupC, kao i c.6174delT u *BRCA2* genu se javljaju u 1,2% populacije (Narod i Foulkes, 2004). Detaljnim ispitivanjem je utvrđeno da ukoliko osoba iz ove populacije nije nosilac jedne od ove tri mutacije, malo je verovatno da će imati bilo koju mutaciju u *BRCA* genima. Identifikacija osnivačkih mutacija u svakoj populaciji olakšava populacioni skrining, ali ih je u etnički mešanim populacijama (Velika Britanija, Kanada, SAD) praktično nemoguće sa sigurnošću identifikovati usled velike genetičke heterogenosti i različitog porekla, što dovodi do greške u tumačenju rezultata populacionih studija asocijacije. Pored visoko učestalih mutacija u *BRCA* genima, postoji veliki broj *novih* mutacija koje se javljaju retko u populacijama, ili su čak karakteristika pojedinih etničkih grupa i porodica.

1.5.1.2.1. Veliki genski rearanžmani u *BRCA1* i *BRCA2* genima

Par godina nakon otkrića *BRCA1* gena (Miki i sar., 1994), već je bilo poznato nekoliko stotina tačkastih mutacija kao i malih insercija i delecija u njemu zahvaljujući razvoju velikog broja kvalitativnih tehnika za njihovu detekciju. Otkriće delecija ili duplikacija više egzona u isto vreme je tada bilo praktično nemoguće zbog nedostatka adekvatnih metoda. Stoga i ne čudi činjenica da su prvi veliki genski rearanžmani, tipa delecija i duplikacija celih egzona (eng. *Large Genomic Rearrangements*- LGR), prijavjeni tek nekoliko godina nakon otkrića *BRCA1* gena. Ideja da mutacije ovog tipa mogu značajno da doprinesu mutacionom spektru je nastala nakon sekvenciranja celog *BRCA1* i otkrića velikog broja *Alu* sekvenci u njegovoj strukturi koje mogu da budu uzrok nejednake homologe rekombinacije i nastanka rearanžmana (Batzer i Deininger, 2002). Otkrićem i unapređivanjem metoda za detekciju ovakvog tipa mutacija, počelo je intenzivno istraživanje prisustva velikih genskih rearanžmana u *BRCA* genima u različitim populacijama, kao i njihovog efekta na proteinskom nivou.

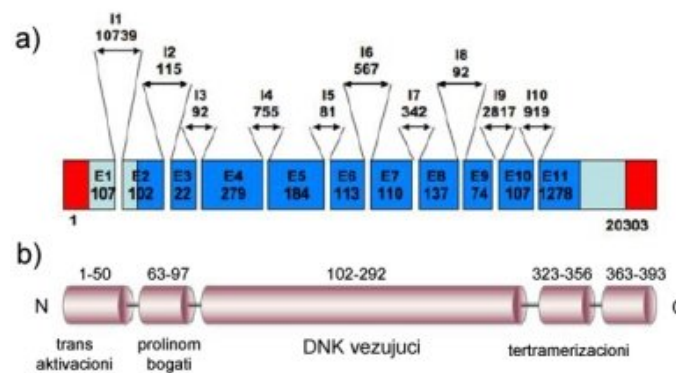
Zahvaljujući novim tehnikama, broj prijavljenih LGR-ova se gotovo utrostručio u poslednjih nekoliko godina. U 2005-oj godini je prijavljeno oko 30ak LGR-ova u *BRCA1* genu (Mazoyer, 2005), da bi u 2011-oj godini broj prijavljenih LGR-ova bio 81 (Garcia-Casado i sar., 2011). Najveći broj opisanih mutacija je nastao intragenskim delecijama i duplikacijama, kao posledica nejednake rekombinacije između kratkih, rasutih mobilnih elemenata kao što su *Alu* sekvence. Ovaj stav je opravdan i gradjom *BRCA1* gena čijih 41,5% čine *Alu* elementi (Smith i sar., 1996; Hansen i sar., 2009). Veliki genski rearanžmani su manje zastupljeni u *BRCA2* genu koji je nešto veći, i u svojoj strukturi ima manju količinu *Alu* sekvenci. Veruje se da je upravo njegova gradnja odgovorna za manju zastupljenost LGRova u ovom genu (Mazoyer, 2005; Hansen i sar., 2009).

1.5.1.3. TP53, gradnja i funkcija

TP53 (eng. *Tumor Protein 53*) je tumor supresorni gen koji se nalazi u 17p13.1 regionu genoma, zauzima 20kb, i građen je od 11 egzona koji kodiraju protein veličine 323

amino kiseline (53kDa). TP53 protein se sastoji od 5 funkcionalnih domena: N-terminalni domen koji je uključen u transkripcionu aktivaciju, prolinom bogat domen, veliki centralni domen koji učestvuje u vezivanju proteina za DNK i u okviru koga se dešava najveći broj mutacija, oligomerizacioni domen odgovoran za TP53 tetramerizaciju, i C terminalni domen koji je negativni regulatorni domen i može da inhibira vezivanje za DNK (Slika 4) (George, 2011).

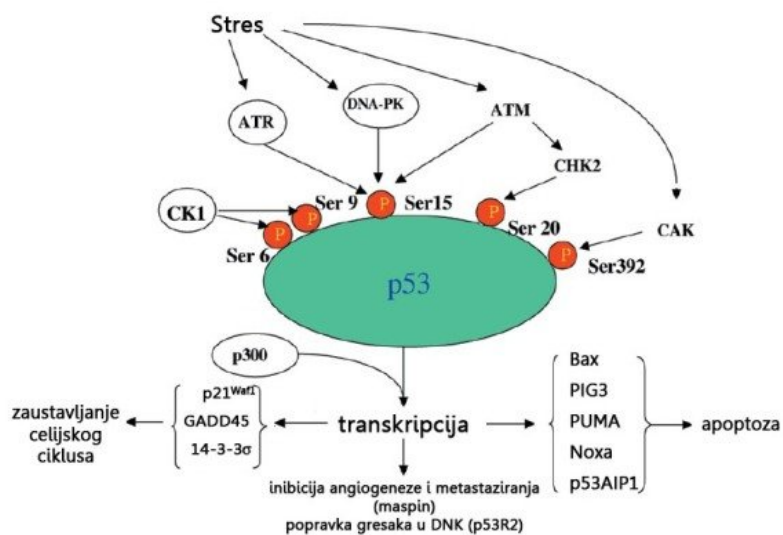
Glavna funkcija TP53 proteina je da eliminiše oštećene ćelije i inhibira njihovu proliferaciju. S obzirom da aktivira niz procesa koji sprečavaju neoplastičnu transformaciju, jedan je od ključnih proteina koji učestvuju u održavanju stabilnosti genoma. U normalnim uslovima je lokalizovan u citoplazmi i jedru, latentan je, i ne utiče na progresiju ćelijskog ciklusa.



Slika 4. a) Gradnja *TP53* gena, b) Funkcionalni domeni TP53 proteina. Preuzeto i prilagođeno iz George, 2011.

Brojni uslovi ćelijskog stresa mogu dovesti do brze indukcije njegove aktivnosti. TP53 se zatim fosforiliše na više mesta, što kao potencijalni ishod ima njegovu stabilizaciju i povećanje nivoa usled smanjene MDM2 (eng. *Mouse Double Minute 2*) zavisne proteolitičke degradacije, kao i povećanje njegovog afiniteta za DNK. Acetilacija lizina i/ili fosforilacija serina na C terminusu promoviše vezivanje za DNK (Slika 5) (Gasco i sar., 2002). Aktivacijom, protein stiče sposobnost vezivanja za DNK, čime ispoljava svoju funkciju regulatora transkripcije brojnih gena. Krajnji cilj je aktivacija niza nizvodnih efektivnih gena koji posreduju tumorskoj supresiji. U glavne efektorne gene čija se ekspresija reguliše uz pomoć TP53 ubrajaju se: inhibitor ciklin zavisnih kinaza p21^{Waf1} kao

i GADD45, koji regulišu ćelijski ciklus u G2 fazi doprinoseći njegovom zaustavljanju. Produkt *p21* gena je negativni regulator ciklin zavisnih kinaza, enzima koji su neophodni za progresiju kroz ćelijski ciklus i deobu. Stimulacijom transkripcije ovog gena, TP53 doprinosi prevenciji proliferacije što daje ćeliji vreme da popravi novonastale greške. Ukoliko su greške značajne i ne mogu se popraviti, aktivacijom ekspresije proapoptotskih proteina, TP53 indukuje apoptozu (George, 2011). Proapoptotski proteini direktno idukovani uz pomoć TP53 su: Bax, Apaf 1, PUMA, p53AIP1, PIDD i NOXA. TP53 direktno aktivira i ekspresiju brojnih gena uključenih u popravku grešaka u DNK (npr. P53R2). Značajna uloga je i aktivacija proteina maspin-a (eng. *Mammary Serine Protease Inhibitor*) koji inhibira angiogenezu, invaziju i metastaze tumora.



Slika 5. Uloga TP53 u odgovoru na stres. Preuzeto i prilagodjeno iz Gasco i sar., 2002.

Ključni regulator aktivnosti TP53 proteina je MDM2 protein koji se vezuje za TP53 i inaktivira ga. Ova interakcija može dovesti i do kompletne eliminacije TP53 proteina proteolitičkom degradacijom. Sa druge strane, TP53 stimuliše transkripciju *MDM2* gena. Uspostavljen odnos negativne povratne sprege kontroliše aktivnost TP53 proteina. U odsustvu funkcionalnog MDM2 proteina, TP53 postaje oslobođen stroge regulacije. U nekim tipovima kancera, povećana MDM2 ekspresija (preko *MDM2* amplifikacije ili nekim drugm mehanizmom) može da vodi konstitutivnoj inhibiciji TP53, i tako izazivati

kancerogenezu bez promena u samom *TP53* genu (George, 2011). Aktivacija TP53 ogleda se dakle u povećanju nivoa proteina usled smanjenja MDM2 zavisne proteolitičke degradacije, i povećanja afiniteta TP53 proteina za DNK.

1.5.1.3.1. Mutacije u *TP53* genu

Nađeno je da je *TP53* gen mutiran u više od 30% humanih kancera (George, 2011; Walerych i sar., 2012), a u ~23% karcinoma dojke predstavlja drugi najčešće mutirani gen posle *PI3KCA* proto-onkogen (Gasco i sar., 2002; Walerych i sar., 2012). Germinativne mutacije u ovom genu su redje ali utiču na razvoj različitih tipova maligniteta uključujući i rani karcinom dojke (Rashid i sar., 2012). Iako se ranije mislilo da doprinos germinativnih mutacija *TP53* gena razvoju karcinoma dojke nije veći od 1%, skorašnje studije ukazuju na veći udeo.

Većina *TP53* mutacija (90%) se dešava u regionu gena koji obuhvata egzone 5-8. Ovi egzoni su odgovorni za vezivanje TP53 proteina za DNK pa mutacije u njima rezultuju u gubitku ove sposobnosti (Bai i Zhu, 2006). Pokazano je i da pacijenti sa mutacijama u 8. egzonu *TP53* gena imaju 6 puta veću verovatnoću da obole od ranog karcinoma dojke. Postoje i podaci o tome da od svih egzona, egzon 8 predstavlja najbitniji indikator za rani karcinom dojke nezavisno od rase, tipa i broja mutacija (Lai i sar., 2002).

1.5.1.3.2. Arg72Pro polimorfizam *TP53* gena

Jedan od najviše izučavanih polimorfizama *TP53* gena je promena guanina u citozin (CGC>CCC) u kodonu 72 egzona 4. Kodon CCC kodira za prolin, a CGC za arginin, pa se i odgovarajuće varijante obeležavaju kao P72 i R72. Kodon 72 kodira poliprolinski domen proteina. S obzirom da se većina štetnih mutacija nalazi u regionu koji je odgovoran za vezivanje sa DNK, precizan doprinos poliprolinskog domena funkciji i regulaciji TP53 je još uvek nepoznat. Pretpostavlja se da je bitan u postizanju punog apoptotskog odgovora na stres i inhibiciju tumorigeneze (Whibley i sar., 2009). Za razliku od DNK vezujućeg

domena, poliprolinski domen je manje evolutivno konzerviran. S obzirom da postoje indicije da Arg72Pro polimorfizam može doprineti funkcionalnim promjenama u *TP53* signalnom putu, brojna istraživanja se i dalje sprovode u cilju rasvetljavanja njegove uloge. Ipak su rezultati velikog broja studija protivrečni, naročito populacionih studija koje su ispitivale vezu ovog polimorfizma sa rizikom za razvoj kancera.

1.5.2. Srednje penetrabilni geni u karcinomu dojke

Druga grupa genskih varijanti koje doprinose riziku za nastanak karcinoma dojke su retki aleli sa umerenim efektom na razvoj bolesti. Geni čije mutacije doprinose 1,5 - 5 puta povećanom riziku za oboljevanje od karcinoma, spadaju u grupu srednje penetrabilnih gena (Tabela 4). Između ostalih, *ATM*, *CHEK2*, *NBS1*, *RAD51C*, *XRCC1*, *PALB2* su identifikovani kao srednje rizični geni sa niskom učestalošću heterozigota (Ripperger i sar., 2009; Mavaddat i sar., 2010; Meindl i sar., 2011; Lalloo i Evans, 2012). Slično kao i visoko penetrabilni geni, i oni imaju značajne uloge u popravci grešaka u DNK. Njihov efekat može biti značajniji u naslednom karcinomu dojke u odnosu na sporadične oblike.

Zbog umerenog povećanja rizika i relativno niske učestalosti ove grupe genskih varijanti, njihov doprinos porodičnom riziku je procenjen na oko 3% (Mavaddat i sar., 2010).

Tabela 4. Srednje penetrabilni geni u karcinomu dojke

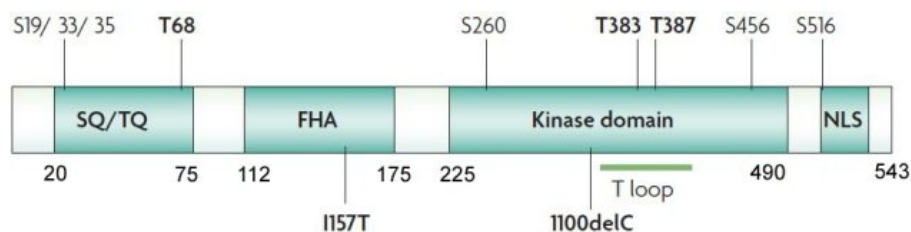
Sindrom	Gen (hromozomska lokacija)	Neoplazma	Životni rizik za karcino m dojke
<i>ATM</i> - zavisni	<i>ATM</i> (11q22.3)	Ženski karcinom dojke, karcinom jajnika	15-20%
<i>CHEK2</i> - zavisni	<i>CHEK2</i> (22q12.1)	Karcinom dojke, jajnika, bešike, kolorektalni	25-37%

<i>PALB2</i> - zavisni	<i>PALB2</i> (16p12.1)	Ženski i muski karcinom dojke, karcinom jajnika, karcinom pankreasa	20-40%
Nasledni karcinom dojke i jajnika (HBOC)	<i>BRIP1</i> (17q22-q24) <i>NBS1</i> (8q21) <i>RAD51C</i> (17q25.1) <i>XRCC2</i> (7q36.1) <i>MRE11A</i> (11q21)	⇒ Karcinom dojke i jajnika	varira

1.5.2.1. CHEK2, gradnja i funkcija

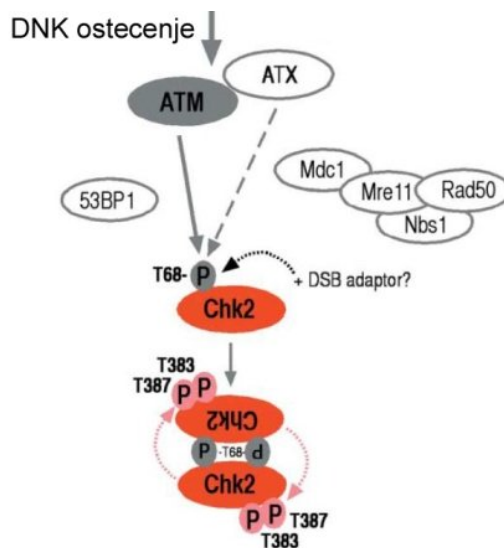
CHEK2 (eng. *Cell Cycle Checkpoint Kinase 2*) gen se nalazi na hromozomu 22q12.1, zauzima oko 50 kb genomske sekvence i sastoji se od 14 egzona koji kodiraju protein od 543 amino kiseline. Struktura *CHEK2* proteina pokazuje tri karakteristična domena: amino - terminalni SQ/TQ motiv (ak 20-75), FHA domen (eng. *Fork Head Associated*) (ak 112-175) i serin/treonin kinazni domen (ak 225-490) (Slika 6) (Nevanlinna i Bartek, 2006; Antoni i sar., 2007). SQ/TQ region je regulatorni domen koji sadrži nekoliko serinskih (SQ) ili treoninskih (TQ) ostataka praćenih glutaminom. Oni predstavljaju mesta fosforilacije od strane ATM kinaze, koja aktivira *CHEK2* u odgovoru na jonizujuće zračenje i druge genotoksične agense koji uzrokuju oštećenja u DNK. FHA domen je uključen u vezivanje za druge proteine. Katalitički kinazni domen zauzima skoro ceo karboksilni deo proteina i sadrži aktivacionu petlju kao i druge serin/treonin kinaze.

CHEK2 je uglavnom neaktivan u odsustvu DNK oštećenja i aktivira se ATM-om u odgovoru na dvolančane prekide u DNK. Aktivacija *CHEK2* kinaze u odgovoru na oštećenje u DNK je višestepeni proces (Bartek i Lukas, 2003) iniciran brzom, ATM-posredovanom, fosforilacijom nekoliko SQ/TQ mesta, naročito treonina 68 na amino-terminalnom kraju proteina.



Slika 6. Gradnja CHEK2 proteina. Sa gornje strane su obeležena mesta fosforilacije (podebljano su ostaci koji fosforilacijom regulišu CHEK2 funkciju), sa donje strane su obeležene najčešće mutacije. Preuzeto i prilagodjeno iz Antoni i sar., 2007.

Ovaj proces dalje promoviše homodimerizaciju i intermolekulska fosforilaciju proteina što vodi njegovoj kinaznoj aktivaciji (Slika 7). Inicijalna, ATM posredovana fosforilacija, se vrši na mestu DNK oštećenja posle koje se CHEK2 brzo kreće kroz jedro prenoseći signal uzbune ka svojim supstratima. Spektar poznatih supstrata CHEK2 kinaze uključuju proteine bitne za regulaciju ćelijskog ciklusa, popravku grešaka u DNK i regulaciju ćelijske smrti, što oslikava njenu široku ulogu u ćeliji. CHEK2 učestvuje u istom signalnom putu kao i BRCA1 i TP53.



Slika 7. Homodimerizacija i intermolekulska fosforilacija CHEK2 u odgovoru na oštećenje u DNK. Preuzeto i prilagodjeno iz Bartek i Lukas, 2003.

Aktiviran CHEK2, pored ostalih supstrata, fosforiliše i BRCA1, koji se oslobadja iz jedarnih kompleksa i vrši svoju ulogu u HR (Antoni i sar., 2007). CHEK2 fosforiliše i transkripcioni faktor FOXM1, čime povećava njegovu stabilnost, i promoviše ekspresiju BRCA2 i XRCC1 (eng. *X-Ray Cross-Complementing group 1*) proteina koji učestvuju u HR i popravci grešaka isecanjem baze (eng. *Base Excision Repair*- BER).

CHEK2 učestvuje i u regulaciji ćelijskog ciklusa fosforilišući CDC25C fosfatazu neophodnu za aktivaciju ciklin zavisnih kinaza (CDK). Fosforilacija CDC25C na inhibitornim regionima uzrokuje zaustavljanje u G2/M fazi i sprečava ulazak u mitozu. CHEK2 fosforiliše i CDC25A, promovišući njegovu degradaciju i uzrokujući zaustavljanje u G1 i S fazama (Antoni i sar., 2007). CHEK2 je uključen i u G1/S i G2/M prelaze kroz TP53. Dok ATM fosforiliše TP53 na S15, CHEK2 ga fosforiliše na S20. Fosforilacijom na S20, TP53 se razdvaja od MDM2 ubikvitin ligaze, što ga oslobadja degradacije od strane ovog proteina i stabilizuje ga. Direktna, CHEK2 posredovana, fosforilacija TP53 takodje inicira njegovu asocijaciju sa histon deacetilazom p300, i reguliše njegovu transkripcionu aktivnost. Za brojne ostatke TP53 koji se fosforilišu u odgovoru na DNK oštećenje, pokazano je da su fosforilisani upravo od CHEK2.

Kada su oštećenja u DNK toliko velika da se ne mogu popraviti, ćelija aktivira apoptozu, a danas postoje dokazi koji povezuju CHEK2 sa ovim procesom. Jedan način je posredna uloga preko aktivacije TP53 zavisne apoptoze. CHEK2 može promovisati apoptozu i fosforilišući E2F1 transkripcioni faktor i tumor supresorni PML (eng. *Pro-Myelocytic Leukaemia*). Interakcijom sa PLK1 i PLK3 (eng. *Polo-like Kinases*), CHEK2 utiče u regulaciji stabilizacije centrozoma.

1.5.2.1.1. Mutacije u *CHEK2* genu

Mutacije u SQ/TQ regulatornom domenu gena sprečavaju aktivaciju CHEK2 proteina ATM kinazom, promene u FHA domenu utiču na međuproteinske interakcije, dok oštećenja u kinaznom domenu inhibiraju katalitičku aktivnost CHEK2 (Nevanlinna i Bartek, 2006). Pokazano je da mutacije u *CHEK2* genu povećavaju rizik za karcinom dojke

dva do tri puta, ali kod osoba sa porodičnom istorijom bolesti čak 4-5 puta. Ovo podržava hipotezu da penetrabilnost *CHEK2* mutacija u porodicama sa visokim rizikom zavisi i od drugih genskih promena i/ili sredinskih faktora (Meindl i sar., 2011).

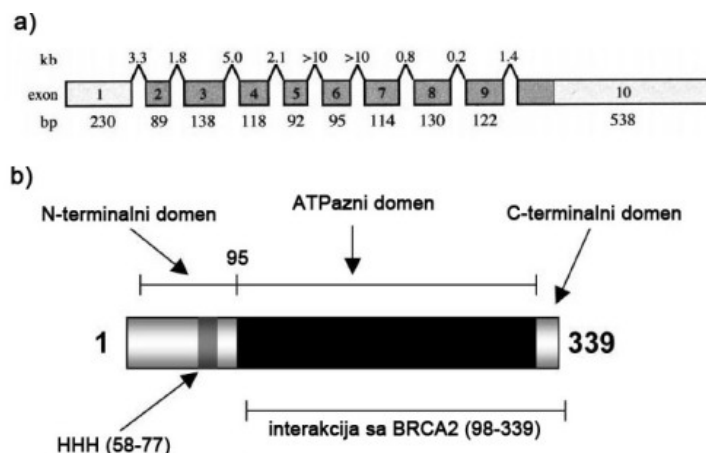
Mutacija 1100delC u 10. egzonu *CHEK2* gena eliminiše kinazni domen proteina nastankom *stop* kodona na poziciji 381 (Bartek i Lukas, 2003). Protein 1100delC je nestabilan, a preostali normalan alel (eng. *wilt type- wt*) se često gubi u tumorima (LOH) što rezultira u potpunom gubitku funkcije kao i u smanjenju količine ukupnog *CHEK2* proteina. Uočene su velike varijacije populacione učestalosti 1100delC mutacije ali je ova varijanta relativno retka u svim ispitivanim populacijama (~3% u severnoevropskim, ~0,5% u južnoevropskim populacijama).

Pored 1100delC mutacije, za sada su poznate još četiri varijante povezane sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma: *missense* mutacije (I157T i S428F), *splice site* mutacija IVS2+1G>A, i velika delecija dva egzona *CHEK2* gena Del5395. Kao i 1100delC, i velika delecija Del5395 vodi nastanku *stop* kodona na poziciji 381, ali nasuprot 1100delC kod koje su svi egzoni očuvani, Del5395 eliminiše egzone 9 i 10. Veruje se da je i njen efekat na povećanje rizika za karcinom dojke sličan kao i u slučaju 1100delC mutacije. Za razliku od *BRCA1* i *BRCA2* mutacija, *CHEK2* varijante izgleda ne povećavaju rizik za karcinom jajnika (Nevanlinna i Bartek, 2006).

1.5.2.2. *RAD51* i *RAD51C*, gradnja i funkcija

Gen *RAD51* se kod čoveka sastoji od 10 egzona i zauzima oko 30kb genomske sekvence. Prvi egzon je nekodirajući, a prosečna dužina kodirajućih egzona je oko 112 bp. Sekvenciranje *RAD51* lokusa (15q14-15) je otkrilo da nekodirajući egzon sadrži CpG ostrvce približne veličine 990 bp (Slika 8) (Schmutte i sar., 1999). Ovaj potencijalni promotorski region sličan je tipičnim promotorskim regionima za *housekeeping* gene, sadrži nekoliko mesta prepoznavanja *Sp1* transkripcionog faktora, ali ne sadrži TATA blok. *RAD51* protein je gradjen od 339 amino kiselina podeljenih u tri funkcionalna domena: amino-terminalni domen (ak 1-95), evolutivno konzervirani ATP-azni domen (ak 119-306)

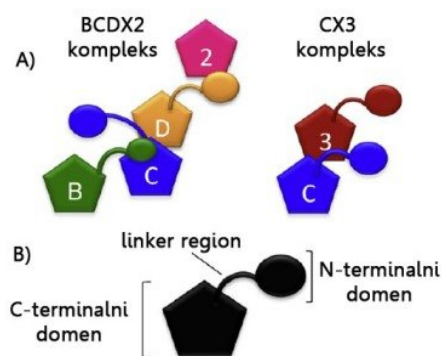
i karboksi-terminalni domen (ak 307-339). Region između amino kiselina 307-339 je mesto gde RAD51 interaguje sa BRC ponovcima BRCA2 proteina i evolutivno je očuvan (Slika 8) (Holt i sar., 2008). Amino-terminalni region sadrži HHH domen (eng. *Helix-Hairpin-Helix*) koji je odgovoran uglavnom za vezivanje za DNK, a kod nekih proteina ima ulogu i u uspostavljanju protein-protein interakcija (Shao i Grishin, 2000).



Slika 8. a) Gradnja *RAD51* gena b) gradnja RAD51 proteina. Preuzeto i prilagodjeno iz Schmutte i sar., 1999 i Holt i sar., 2008.

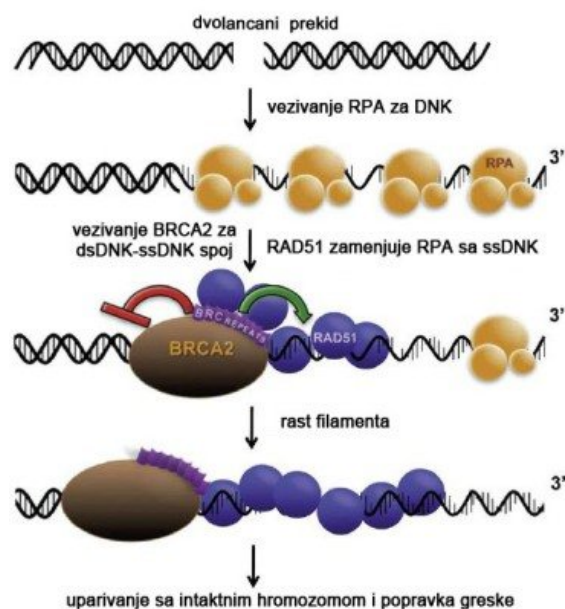
Kloniranjem gena koji odgovaraju na greške u DNK i poredjenjem njihovih sekvenci, pronadjeno je pet gena koji kodiraju proteine srodne RAD51: *RAD51B* (RAD51L1), *RAD51C* (RAD51L2), *RAD51D* (RAD51L3), *XRCC2* i *XRCC3* (Thacker, 2005; Richardson, 2005; Somyajit i sar., 2010; Suwaki i sar., 2011). Oni dele 20-30% sličnosti na proteinskom nivou i imaju konzervirane sekvence identifikovane preventivno u regionima koji formiraju DNK i ATP-vezujuće motive. Ovi proteini se označavaju kao paralogi proteini i nastali su od zajedničkog predačkog gena koji je prošao kroz procese duplikacija, najčešće usled nejednakog *crossingover-a* tokom mejoze, i nezavisno su stekli nove funkcije (Thacker, 2005). Tako RAD51C učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa aktivacijom od strane CHEK2 kinaze i popravci grešaka u DNK, RAD51D u održanju stabilnosti telomera, a XRCC3 u regulaciji replikacije i progresiji replikacione viljuške (Somyajit i sar., 2010). Biohemijske studije su pokazale postojanje dva velika proteinska kompleksa: RAD51B–RAD51C–RAD51D–XRCC2 (BCDX2) i RAD51C–XRCC3 (CX3)

u ćelijama čoveka (Richardson, 2005, Somyajit i sar., 2010). Modelovanje homologije proteinske strukture i proučavanje interakcija ovih paraloga pokazalo je da je region između N i C terminalnog domena (*linker region*), koji je prisutan kod svih osim kod XRCC2, neophodan za njihovu međusobnu interakciju (Slika 9) (Suwaki i sar., 2011). Većina ovih proteina ima DNK stimulisanu ATP-aznu aktivnost i preferencijalno se vezuju za jednolančane DNK (Thacker, 2005).



Slika 9. Kompleksi RAD51 paraloga izolovani iz humanih ćelija. Preuzeto i prilagodjeno iz Suwaki i sar. 2011.

Kada se ćelija izloži genotoksičnim agensima ili zračenju, RAD51 se regrutuje ka mestima nastalih oštećenja u DNK gde učestvuje u procesu HR. On formira dugačke helikoidne polimere koji obavijaju jednolančanu DNK na mestu prekida. Rezultujući nukleoproteinski filament katalizuje invaziju lanca na intaktni, homologi DNK molekul. Sastavljanje RAD51 monomera na prekid u DNK je relativno spor proces koji je olakšan uz pomoć BRCA2 (Slika 10). Regrutovanje RAD51 zavisi i od njegovih paraloga koji interaguju direktno sa RAD51 podstičući njegovu ulogu u procesu invazije lanca u homologoj rekombinaciji (Suwaki i sar., 2011).



Slika 10. Formiranje nukleoproteinskog filameta RAD51 proteina na mestu oštećenja DNK. Preuzeto i prilagodjeno iz Carreira i sar., 2009.

Medju pet RAD51 paraloga, RAD51C je jedini koji se nalazi u oba proteinska kompleksa (BCDX2 i CX3). RAD51C deli 27% sekvenčne sličnosti sa RAD51, sa najočuvanijim DNK vezujućim domenom (French i sar., 2003). Pretpostavlja se da RAD51C doprinosi popravci grešaka u DNK regulišući translokaciju RAD51 iz citoplazme u jedro. Za razliku od drugih paraloga kao i samog RAD51, RAD51C protein poseduje signal za lokalizaciju u jedro, što mu olakšava samostalnu jedarnu translokaciju kao i pomeranje u kompleksu sa drugim proteinima (Suwaki i sar., 2011).

Analiza kinetike RAD51 i RAD51C pokazala je da se oba proteina lokalizuju u nivou oštećenja u roku od nekoliko minuta nakon njegovog nastanka (Badie i sar., 2009). RAD51 prvi disocira sa mesta prekida, a RAD51C ostaje na tom mestu značajno duži period vremena i može da deluje kao „regrutujuća platforma“ za kasnije faze HR. Ovo zapažanje bilo je u skladu sa pretpostavkom da RAD51C ima ulogu i u ranim, i u kasnim fazama HR (Suwaki i sar., 2011). Pokazano je i da je RAD51C neophodan za fosforilaciju CHEK2 od strane ATM, što ga povezuje sa regulacijom ćelijskog ciklusa (Somyajit i sar., 2010; Suwaki i sar., 2011). Još uvek se ne zna da li je RAD51C direktno fosforilisan od

strane ATM, ali s obzirom da sadrži TQ motive koji su ciljna mesta ATM kinaze, moguće je da je RAD51C jedan od njenih supstrata. Bitno je napomenuti i vezu između RAD51 i TP53 proteina. Pokazano je da TP53 najverovatnije inhibira invaziju lanca posredovanu sa RAD51 i na taj način sprečava HR. Najverovatniji mehanizam se odnosi na kompeticiju ova dva proteina za vezivanje za specifične sekvence u DNK (Yoon i sar., 2004).

1.5.2.2.1. *RAD51* i *RAD51C* mutacije

Za RAD51 protein se veruje da ima ulogu tumor supresora jer je deo proteinskog kompleksa koji je uključen u DNK rekombinaciju i popravku grešaka, i interaguje direktno ili indirektno sa drugim poznatim tumor supresornim proteinima. S obzirom na interakciju sa BRCA1 i BRCA2, pretpostavilo se da promene u *RAD51* doprinose nastanku karcinoma dojke (Richardson, 2005). Štetne mutacije u ovom genu su vrlo retke i najverovatnije populaciono specifične, pa je stoga potraga za njima otežana. Ipak, dva funkcionalna polimorfizma nukleotidne sekvence (SNP) u 5'ne-translatiranom regionu gena (eng. *Untranslated Region- 5'UTR*), 135G>C i 172G>T, predstavljaju promene koje se intenzivno izučavaju u svetlu njihove veze sa nastankom kancera. Biološki efekat ovih polimorfizama se još uvek ispituje.

U studiji koja je postala osnova za istraživanje mutacija u *RAD51C*, Meindl i saradnici (2010) su pokazali povećanje rizika za karcinom dojke/jajnika povezano sa germinativnim mutacijama u ovom genu. Na najčešćim mutacijama koje su bile *missense* tipa uradjene su detaljne funkcionalne analize koje su pokazale njihovu štetnost na proteinskom nivou. Jedno od mogućih objašnjenja efekta ovih mutacija odnosi se na ukidanje ili smanjenje sposobnosti RAD51C u formiranju kompleksa sa paralogima. Ovo ispitivanje je pokazalo visoku penetrabilnost mutacija u *RAD51C* genu i njihovu kompletnu segregaciju u porodicama. Značaj *RAD51C* još uvek nije potvrđen drugim studijama, delom zbog nedovoljno velikog uzorka izabranog za ispitivanje, a delom zbog nedostatka funkcionalnih analiza pronađenih *missense* mutacija što bi moglo da bude uzrokuje „previd“ u značajnosti prijavljenih promena. Interesantno je da histopatologija *RAD51C* vezanih

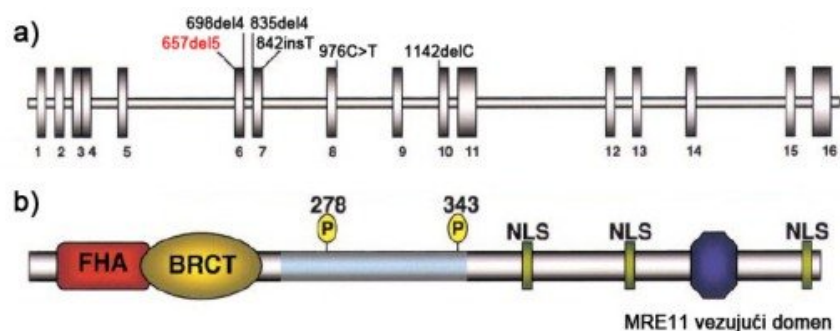
karcinoma dojke/jajnika liči na one kod kojih je mutiran *BRCA2* ali ne na one sa *BRCA1* mutacijama (Suwaki i sar., 2011). Razlog verovatno leži u činjenici da *RAD51* i *BRCA2* učestvuju u efektornim fazama HR, dok *BRCA1* ima ulogu uzvodne signalne karike koja detektuje i prenosi signal oštećenja.

1.5.2.3. NBS1 (NBN/Nibrin), gradnja i funkcija

Gen *NBS1* (eng. *Nijmegen Breakage Syndrome 1*) sadrži 16 egzona koji zauzimaju oko 50kb genomske sekvence na hromozomu 8q21 i transkribuje se u dve iRNK koje se razlikuju u dužini 3'UTR regiona (2,6 i 4,8 kb) (Tauchi i sar., 2002; Saito i sar., 2013). Protein *NBS1* se sastoji od tri funkcionalna domena molekulske težine 95kDa. Na N kraju se nalaze visoko konzervirani FHA (eng. *Fork Head Associated*) i BRCT (eng. *Breast Cancer C Terimus*) regioni (Slika 11). FHA/BRCT region direktno interaguje sa fosforilisanim histonom H2AX u prisustvu DSBs i dalje regrutuje druge članove MRN kompleksa (*MRE11* i *RAD50*) u blizinu prekida. C terminalni region sadrži vezujuće mesto za *MRE11* (Tauchi i sar., 2002; Zhang i sar., 2006). U centralnom regionu proteina se nalazi nekoliko serin/glutamin motiva koji predstavljaju mesto fosforilacije od strane ATM i ATR kinaza. Serinski ostaci na pozicijama 278 i 343 se fosforilišu ATM-om u odgovoru na jonizujuće zračenje i ova interakcija je odgovorna za regulaciju ćelijskog ciklusa u S fazi i u održanju stabilnosti telomera.

Iako *NBS1* sam po sebi nema DNK vezujuću i kinaznu aktivnost, on ima ključnu ulogu u popravci grešaka u DNK kao glavni regulator MRN kompleksa (*MRE11-RAD50-NBS1*) u lokalizaciji na mesto oštećenja i aktivaciji njegove nukleazne aktivnosti (Slika 12). Proces premeštanja *MRE11* i *RAD50* iz citoplazme u jedro pri nastanku oštećenja se ukida u odsustvu *NBS1* (Assenmacher i Hopfner, 2004; Zhang i sar., 2006).

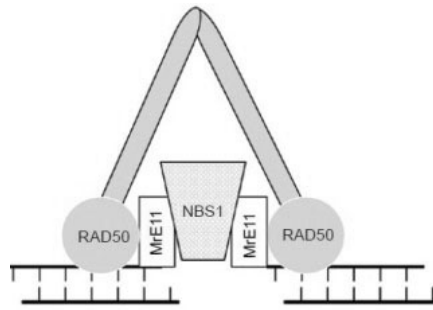
NBS1 je uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa u S fazi preko ATM posredovane *CHEK2* fosforilacije indukovane jonizujućim zračenjem. U regulaciji ove tačke ćelijskog ciklusa je uključen i preko ATM-SMC1 i ATM/FANCD2 puteva (Tauchi i sar., 2002, Zhang i sar., 2006). Uloga *NBS1* u G1 i G2 fazama se i dalje ispituje.



Slika 11. a) gradnja *NBS1* gena, b) funkcioni domeni *NBS1* proteina. Preuzeto i prilagodjeno iz Tauchi i sar., 2002.

Primećeno je da MRN kompleksi postoje i za vreme S faze ćelijskog ciklusa, i da se nalaze u blizini PCNA proteina koji je prisutan u replikaciji DNK. Veruje se da *NBS1* ima bitnu ulogu u zaustavljanju replikacione viljuške i olakšavanju replikacije (Tauchi i sar., 2002; Assenmacher i Hopfner, 2004).

Telomere su visoko specijalizovane nukleusne proteinske strukture koje stabilizuju i štite krajeve hromozoma. S obzirom da konvencionalna replikaciona mašinerija ne može da sintetiše novu DNK na krajevima linerarnih hromozoma, replikacija rezultuje u progresivnoj eroziji telomerne DNK. Aktivacijom telomeraza koje produžavaju jedan telomerni lanac, sprečava se postepeni gubitak DNK sa krajeva hromozoma (Zhang i sar., 2006). *NBS1* učestvuje u formiranju 3'jednolančane DNK na telomerama što je neophodan preduslov za angažovanje telomeraze. Sa druge strane, uključen je i u put elongacije telomera posredovanom sa HR. Primećeno je da krvne ćelije pacijenata sa *Nimejgen Breakage* sindromom imaju skraćene telomere (Tauchi i sar., 2002). U ćelijama, u ranoj S fazi, *NBS1* interaguje sa TRF2 proteinom koji ima važnu ulogu u invaziji lanca i stabilizaciji T petlje koja se nalazi na krajevima hromozoma. Proteini MRE11 i RAD50 se vezuju za TRF2 kroz ceo ćelijski ciklus, što ukazuje na to da *NBS1* kao deo MRN kompleksa učestvuje u replikaciji telomera na sličan način kao i u popravci grešaka u DNK.



Slika 12. Preuzeto iz Zhang i sar., 2006: Šematski prikaz MRN kompleksa gradjenog od dimera RAD50 i MRE11 i monomera NBS1. RAD50 i MRE11 se regrutuju na mesto prekida zahvaljujući interakciji NBS1 sa γ H2AX. RAD50 dimeri se vezuju za DNK ATP-aznim motivima i drže prekinute krajeve zajedno. MRE11 obradjuje prekinute krajeve svojom nukleaznom aktivnošću.

1.5.2.3.1. Mutacije u *NBS1* genu

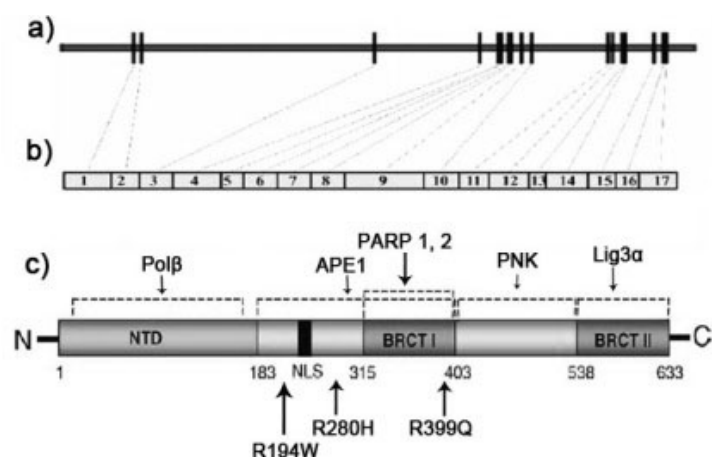
Nosioci homozigotnih mutacija u *NBS1* genu obolevaju od *Nijmegen Breakage Sindroma* (NBS), retkog autozomno recesivnog oboljenja okarakterisanog mikrocefalijom, zaostalošću u rastu, imunodeficijencijom, i predispozicijom za brojne malignitete uključujući i karcinom dojke (Ripperger i sar., 2009; Apostolou i Fostira, 2013). 40% NBS pacijenata će razviti neki oblik karcinoma pre 21. godine (Hollestelle i sar., 2010). Delecija 5 nukleotida u 6. egzonu (657del5) je najučestalija patogena *NBS1* varijanta koja je u homozigotnom obliku otkrivena kod 90% NBS pacijenata, a u isto vreme čini više od 90% svih varijanti u *NBS1* genu (Demuth i Digweed, 2007; Huzarski i sar., 2013).

Prvi pokazatelj moguće asocijacije *NBS1* sa rizikom za kancer došao je nakon pronalaska 657del5 mutacije medju srodnicima NBS pacijenata, kod kojih je utvrđen povećan rizik za oboljevanje. Značaj ove mutacije je kasnije ispitivan i kod pacijenata obolelih od kancera ali bez porodične istorije NBS-a (di Masi i Antoccia, 2008). Pronadjeno je da je 657del5 dva puta češća kod pacijenata nego kod zdravih osoba. Delecija 5bp na poziciji 657 deli protein na dva dela: 26 kDa fragment (p26-nibrin) koji sadrži FHA i BRCT domene, i 70 kDa fragment (p70-nibrin) koji predstavlja C terminalni deo nibrina (Demuth i Digweed, 2007). Okrnjeni, C terminalni deo proteina i dalje ima

sposobnost vezivanja za MRE11 što je ključno u procesu embriogeneze i deobe ćelija. Ova činjenica objašnjava pojavu da su vijabilne mutacije u *NBS1* genu kod pacijenata pronađene samo u ograničenom regionu gena između egzona 6 i 10, i ukazuje na neophodnost funkcionalnog C terminalnog regiona NBS1 proteina. 657del5 mutacija je hipomorfna što znači da je novonastali protein delimično funkcionalan zahvaljujući novom okviru čitanja koji je stvoren mutacijom. Samo hipomorfni *NBS1* homozigoti preživljavaju dok kompletna inaktivacija *NBS1* vodi smrti embriona.

1.5.2.4. XRCC1, gradnja i funkcija

Gen *XRCC1* (eng. *X-ray Repair Cross Complementing Group 1*) se nalazi u 19q13.2 regionu, gradjen je od 17 egzona i zauzima 32kb genomske sekvence (Thompson i West, 2000). Protein XRCC1 (od 633 amino kiseline) ima dva BRCT domena (BRCT1 i BRCT2) koji se nalaze u centralnom i na C terminalnom kraju (Slika 13). BRCT2 je odgovoran za vezivanje DNK ligaze 3 (LIG3) i neophodan je za popravljjanje jednolančanih prekida (eng. *Single Strand Breaks* - SSB) u DNK naročito za vreme G0/G1 faze ćelijskog ciklusa (Huang i sar., 2009).



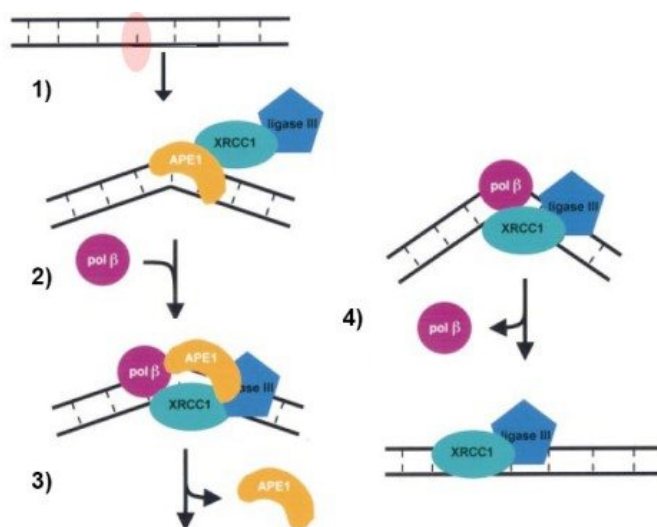
Slika 13. A) genomski region *XRCC1* b) egzoni c) funkcioni delovi proteina. Preuzeto iz Caldecott i sar., 2003.

BRCT1 domen se vezuje za protein koji prepoznaje SSBs, PARP1 (eng. *Poly ADP-ribose Polymerase*), i negativno ga reguliše, što je neophodno za efikasnu popravku grešaka za vreme G1 i S/G2 faza ćelijskog ciklusa. N terminalni region je odgovoran za interakciju sa DNK polimerazom β (Pol β), najmanjom od osam poznatih DNK polimeraza u sisarskim ćelijama, za koju se zna da katalizuje popunjavanje oštećenja dužine 1-6 nukleotida na mestima prekida.

XRCC1 ima funkciju vodećeg proteina u procesu popravke grešaka u DNK isecanjem baze (eng. *Base Excision Repair*- BER). BER-om se ispravlja većina grešaka u DNK (deaminacija, depurinacija, oksidativna oštećenja) koje nastaju ćelijskim metabolizmom. BER je visoko konzerviran mehanizam sačinjen od 5 enzimskih reakcija. Prva je prepoznavanje i uklanjanje izmenjene baze uz pomoć DNK glikozilaze. Ovim procesom nastaje prazno mesto bez baze, koje se zatim prepoznaje i iseca enzimom apurinskom endonukleazom (APE1) koja na krajevima ostavlja 3'OH i 5'dRP (eng. *deoxyribose phosphate*). 5'dRP se uklanja aktivnošću Pol β . U kratkom putu BER-a, Pol β ugrađuje bazu koja nedostaje, a novonastali usek se zatvara DNK ligazom (LIG3) koja se nalazi u kompleksu sa XRCC1.

Protein XRCC1 nema enzimsku aktivnost, ali interakcijom i usmeravanjem drugih proteina predstavlja neophodnu kariku za popravku SSBs u DNK BER-om. Interakcijom sa APE1 olakšava obradu mesta isečene baze u cilju ubrzavanja popravke novonastale greške i obezbeđuje adekvatan pristup DNK polimerazama (Vidal i sar., 2001). Interaguje sa PARP1 i negativno ga reguliše, ali sama uloga ove interakcije nije poznata (Slika 14). PARP1 je jedarni DNK vezujući protein koji detektuje prekide u DNK. S obzirom da ima sposobnost vezivanja za useke nastale u DNK isecanjem baze, veruje se da XRCC1 i sam po sebi može imati senzornu funkciju (Vidal i sar., 2001). U slučajevima kada DNK krajevi nastali prekidom nisu podesni za delovanje polimeraze, XRCC1 regrutuje PNK (eng. *Poly nucleotide Kinase*) enzim koji ih obradjuje. Uz to, prisustvo XRCC1 stimuliše i DNK fosfataznu i DNK kinaznu aktivnost PNK. Treći protein koji interaguje sa XRCC1 je LIG3. BRCT domen LIG3 formira kompleks sa BRCT2 domenom XRCC1, što omogućava povezivanje krajeva DNK. Mutacije u BRCT2 regionu *XRCC1* gena onemogućavaju ovu interakciju i sprečavaju popravku grešaka u G1 fazi. Ipak, popravka grešaka se nastavlja u

S fazi što ukazuje na to da XRCC1 učestvuje i u procesu nezavisnom od LIG3 (Thompson i West, 2000). Činjenica da interaguje sa tri proteina koji imaju enzimsku aktivnost (PARP, Pol β i LIG3) ukazuje da XRCC1 može biti deo koji olakšava i koordiniše BER i popravku SSBs u DNK. Nakon popunjavanja praznine od strane Pol β , XRCC1 služi kao most između nje i LIG3, čineći LIG3 odmah dostupnom u procesu završetka popravke greške. Smatra se takodje, da XRCC1 može imati i ulogu u regulaciji transkripcije s obzirom da poseduje BRCT domene za koje se zna da kod mnogih proteina imaju ulogu u aktivaciji transkripcije.



Slika 14. Model popravke nedostatka baze BER-om. 1) APE1 se u kompleksu sa XRCC1 i LIG3 vezuje na mesto greške u DNK i savija je. APE1 zaseca lanac u kome se nalazi lezija, 2) Pol β se regrutuje i uključuje u kompleks sa APE1 i XRCC1, 3) APE1 se oslobadja, XRCC1 i Pol β i dalje savijaju DNK pre ugradjivanja nukleotida, 4) zaostali usek se popunjava XRCC1/LIG3 kompleksom. Preuzeto iz Vidal i sar., 2001.

1.5.2.4.1. Mutacije u *XRCC1* genu

Više od 60 polimorfizama nukleotidne sekvence *XRCC1* gena je prijavljeno u *Ensembl* bazi podataka (www.ensembl.org). Od njih je ~30 smešteno u kodirajućim i promotorskim regionima gena. Najizučavaniji polimorfizmi su: u kodonu 194 (egzon 6,

C>T, Arg>Trp), kodonu 280 (egzon 9, G>A, Arg>His), i kodonu 399 (egzon 10, G>A, Arg>Gln) (Hung i sar., 2005; Hu i sar., 2005). S obzirom da se Arg399Gln (R399Q) polimorfizam nalazi u BRCT regionu XRCC1 preko koga se odigrava interakcija sa PARP, intenzivno se izučava njegov funkcionalni značaj. Studije su pokazale vezu Gln399 alela sa značajnim smanjenjem kapaciteta popravke grešaka u DNK. Arg194Trp (R194W) i Arg280His (R280H) su locirani u region koji razdvaja N terminalni i BRCT domen XRCC1, ali se veruje da iako utiču na strukturu proteina, ne menjaju njegovu funkciju (Huang i sar., 2009).

1.5.3. Nisko penetrabilni geni u karcinomu dojke

Neobjašnjen deo nasledne predispozicije za karcinom dojke se pripisuje poligenom modelu koji uključuje kombinaciju velikog broja pojedinačnih varijanti nisko penetrabilnih polimorfizama nukleotidne sekvence (SNP). Genomske studije asocijacije (GWAS) koriste panele miliona SNP-ova u cilju identifikacije uobičajenih genskih varijanti. Njima je uspešno identifikovano više od 100 niskorizičnih lokusa povezanih sa kancerom, od kojih bar 17 sa karcinomom dojke (Tabela 5). Ove varijante, iako su česte, doprinose malom povećanju rizika (relativni rizik manji od 1,5) (Apostolou i Fostira, 2013).

FGFR gen kodira receptor za faktor rasta fibroblasta (FGF) koji je uključen u regulaciju proliferacije, preživljavanja, migracije i diferencijaciju ćelija. SNP u intronu 2 ovog gena je jedan od čestih alela za koji se veruje da ima najveći doprinos relativnom riziku za karcinom dojke (Mavaddat i sar., 2010; Lalloo i Evans, 2012). Ovaj SNP je odgovoran za povećanje ekspresije *FGFR2* što može da vodi proliferaciji i preživljavanju tumorskih ćelija.

Nekoliko čestih genskih varijanti je povezano sa određenim pod-tipovima kancera. *TOX3* (ranije poznat kao *TNRC9*) i njegova varijanta rs3803662 doprinosi povećanju rizika kod homozigotnih nosilaca naročito kod ER+ karcinoma dojke (Collins i Politopoulos, 2011). Proteinski product *MAP3K1* gena je deo Ras/Raf/MEK/ERK signalnog puta (kao i FGF2R), i odgovoran je za regulaciju transkripcije brojnih gena. Polimorfizam u ovom

genu je povezan sa ER+ i PR+ karcinomima dojke kao i sa Her2+ oblicima (Collins i Politopoulos, 2011).

Pod okriljem poligenog modela za karcinom dojke, 12 najbitnijih niskorizičnih varijanti doprinose ukupnom riziku sa oko 8,3%, što ukazuje na to da veliki broj njih još uvek nije otkriven.

Tabela 5. Nisko rizični aleli u karcinomu dojke identifikovani velikim studijama asocijacija (GWAS)

Gen	Lokus	SNP	Relativni rizik za karcinom dojke
<i>FGF2R</i>	10q26	rs2981582	1,26(1,23-1,30)
<i>TOX3/TNRC9</i>	16q12	rs3803662	1,11(1,08-1,14)
<i>MAP3K1</i>	5q11	rs889312	1,13(1,10-1,16)
<i>CASP8</i>	2q33	rs1045485	0,89 (0,85-0,94)
<i>LSP1</i>	11p15	rs3817198	1,07(1,04-1,11)
<i>TNP1/IGFBP5/IGFBP2/TNSI</i>	2q35	rs13387042	1,12(1,09-1,15)
<i>MRSP30</i>	2q35	rs10941679	1,11(1,03-1,20)
<i>RAD51L1</i>	14q24.1	rs999737	0,94(0,88-0,99)
<i>COX11</i>	17q23.2	rs6504950	0,95(0,92-0,97)
<i>NOTCH2</i>	1p11.2	rs11249433	1,16(1,09-1,24)
<i>CDKN2a</i>	9q	rs1011970	1,09 (1,04–1,14)
	10q	rs704010	1,07 (1,03–1,11)
	10q	rs2380205	0,94 (0,91–0,98)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Obzirom da prisustvo mutacija u *BRCA1* i *BRCA2* genima ne može da opiše celu genetičku osnovu naslednog karcinoma dojke, istraživanje prisustva populaciono specifičnih mutacija u drugim genima kod *BRCA1/2* negativnog naslednog karcinoma dojke u Srbiji, a radi preciznijeg definisanja nasledne predispozicije, predstavlja cilj ovog istraživanja. Da bi se ovaj cilj ispunio potrebno je:

- U grupi osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom za karcinom dojke i/ili jajnika kod kojih je sekvenciranje *BRCA1* i *BRCA2* gena pokazalo negativan rezultat (grupa naslednog karcinoma dojke/jajnika), ispitati prisustvo velikih genskih rearanžmana u *BRCA1/2* genima. U istoj grupi ispitati prisustvo i učestalost 1100delC i Del5395 mutacija u *CHEK2* genu, i 657del5 mutacije u *NBS1* genu.
- Kod *BRCA1/2* negativnih pacijenata sa ranim karcinomom dojke (≤ 40 godina) i sa pozitivnom porodičnom istorijom za karcinom dojke i/ili jajnika, ispitati prisustvo mutacija u 8. egzonu *TP53* gena.
- U grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika ispitati prisustvo i učestalost mutacija u *RAD51C* genu.
- Utvrditi raspodelu polimorfničkih varijanti (135G>C u *RAD51*, Arg72Pro u *TP53* i Arg399Gln u *XRCC1* genima) u grupi naslednog karcinoma dojke, u grupi karcinoma dojke neodređenog u odnosu na porodičnu istoriju bolesti (sistematski uzorak) i u kontrolnoj grupi zdravih osoba.
- Ispitati da li neka od polimorfničkih varijanti *RAD51*, *TP53* i *XRCC1* gena doprinosi riziku za nastanak karcinoma dojke u ispitivanim grupama.
- Ispitati distribuciju *RAD51*, *TP53* i *XRCC1* genotipova u odnosu na parametre tumora i parametre domaćina tumora.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

3.1.1. Uzorak naslednog karcinoma dojke/jajnika

Ispitanike ove grupe činili su uzorci periferne krvi 57 osoba iz porodica sa većim brojem obolelih od karcinoma dojke/jajnika, ili sa ranim karcinomom dojke (Tabela 6). Za

sve ispitanike je BRCAPRO, program koji procenjuje verovatnoću postojanja mutacija u *BRCA1* i *BRCA2* genima, pokazao vrednost $\geq 10\%$. Celi kodirajući regioni *BRCA1* i *BRCA2* gena su prethodno sekvencirani, i utvrđeno je da su svi ispitanici negativni na prisustvo štetnih tačkastih mutacija, kao i malih insercija i delecija u oba gena.

Ispitanici svrstani u ovu grupu spadaju u visokorizičnu grupu za oboljevanje od karcinoma dojke/jajnika. Uzorci iz ove grupe sakupljeni su iz različitih delova Srbije u periodu od 2006. do 2013. godine.

Tabela 6. Ispitanici iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika podeljeni u grupe u odnosu na porodičnu istoriju bolesti i tip karcinoma

<i>Uzorak naslednog karcinoma dojke/jajnika</i>	<i>Broj (%)</i>
<i>Grupa A</i> Pacijentkinje obolele od karcinoma dojke, sa bar jednim slučajem karcinoma dojke ili karcinoma jajnika u porodici, u prvom ili drugom stepenu srodstva	25 (43.9)
<i>Grupa B</i> Pacijentkinje sa ranim karcinomom dojke dijagnostikovanim pre 35. godine života	14 (24.6)
<i>Grupa C</i> Osobe muškog pola obolele od karcinoma dojke	4 (7)
<i>Grupa D</i> Pacijentkinje sa karcinomom jajnika i bar jednim slučajem karcinoma dojke ili karcinoma jajnika u porodici, u prvom stepenu srodstva	1 (1.7)
<i>Grupa E</i> Pacijentkinje sa karcinomom dojke i karcinomom jajnika	3 (5.3)
<i>Grupa F</i> Zdrave osobe koje imaju dva ili više slučajeva karcinoma dojke ili karcinoma jajnika medju prvim srodnicima, uključujući bar jedan slučaj sa bolešću pre 50. godine života	10 (17.5)
<i>Ukupno</i>	57 (100)

3.1.2. Sistematski uzorak karcinoma dojke

Sistematski uzorak karcinoma dojke (neodređen u odnosu na porodičnu istoriju bolesti) činilo je 107 pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke. Starost u vreme dijagnoze kretala se u rasponu 32 – 82. godine (medijana 52 godine). Uzorci periferne krvi pacijentkinja koje su uključene u ispitivanje, sakupljeni su na Klinici za medikalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od 2007. do 2009. godine. Svi ispitanici, kako oni u grupi osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom, tako i oni u grupi sistematskog uzorka karcinoma dojke, potpisali su informisani pristanak odobren od strane Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. U Tabeli 7 je prikazan pregled histopatoloških karakteristika karcinoma dojke i karakteristika pacijentkinja iz sistematskog uzorka karcinoma dojke.

Tabela 7. Karakteristike tumora i domaćina tumora sistematskog uzorka karcinoma dojke

<i>Karakteristike</i>	<i>Broj (%)</i>
Starost u vreme dijagnoze	
≤52	56 (52,3)
>52	51 (47,7)
Status menopauze	
Premenopauza	53 (49,5)
Postmenopauza	54 (50,5)
Veličina tumora	
pT1	48 (44,9)
pT2	19 (17,8)
pT3	12 (11,2)
difuzni	16 (14,9)
nema podatak	12 (11,2)
Histološki tip	
Duktalni (IDC)	53 (49,5)
Lobularni (ILC)	35 (32,7)
Tubularni	2 (1,9)
Medularni	4 (3,7)
Drugo (mešano, retki tipovi)	11 (10,3)
Nema podatak	2 (1,9)

Histološki gradus	
I	4 (3,7)
II	73 (68,2)
III	18 (16,8)
Nepoznato	10 (9,4)
Nema podatak	2 (1,9)
N status	
N0	16 (15)
N+	33 (30,8)
Nema podatak	58 (54,2)
Status estrogenog receptora	
ER+	62 (57,9)
ER-	39 (36,5)
Nema podatak	6 (5,6)
Status receptora za progesteron	
PR+	55 (51,4)
PR-	46 (43)
Nema podatak	6 (5,6)
Her2 status	
Her2+	40 (37,4)
Her2-	52 (48,6)
Nema podatak	15 (14)
Udaljene metastaze- M	
M0	24 (22,4)
M1	5 (4,7)
Nema podatak	78 (72,9)

3.1.3. Kontrolna grupa

Kontrolnu grupu je činilo 114 uzoraka briseva grlića materice žena koje su došle na ginekološki pregled i citološki skrining na Institut za onkologiju i radiologiju Srbije. Kriterijumi za uključivanje bili su: uredan ginekološki nalaz sa normalnim Papa nalazom i odsustvo prethodne istorije postojanja prekancerskih i kancerskih lezija ginekološke regije. Odabir je vršen među 223 žena, koje su zadovoljavale pomenute kriterijume,

metodom izbora preko tablice slučajnih brojeva, po poklapanju po godinama unutar intervala (<40, 40-49, 50-59, ≥60 godina) sa grupama obolelih žena. Opseg godina u kontrolnoj grupi je bio 31-75 sa medijanom od 53 godine.

3.2. IZOLOVANJE GENOMSKE DNK

3.2.1. Izolovanje DNK na aparatu *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation*

ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation je sistem koji omogućava izolaciju i prečišćavanje nukleinskih kiselina iz različitih tipova bioloških uzoraka. Sistem se bazira na afinitetnom vezivanju (adsorpciji) DNK molekula za specifično dizajnirane membrane od staklenih vlakana. Rastvori specifične jonske jačine i pH, kojima se membrane ispiraju u nekoliko sukcesivnih koraka, prečišćavaju i drže DNK vezanu za njih, dok se ostale komponente ćelijskog lizata ispiraju i odbacuju. Poslednje ispiranje se odnosi na nanošenje rastvora koji favorizuje odvajanje prečišćene DNK od membrane i njenu eluciju.

Za izolaciju DNK korišćen je *BloodPrep™ Chemistry Kit* koji omogućava izolaciju DNK iz sveže ili zamrznute krvi i kultura ćelija. Za izolaciju je potrebno 150 µl sveže ili zamrznute pune krvi, do 10⁶ ćelija iz ćelijske kulture ili materijal dobijen uzimanjem brisa. Materijal iz koga se DNK izoluje se resuspenduje u *BloodPrep DNA Purification Soution-* u koji omogućava liziranje ćelija. Ova suspenzija se nanosi na specijalno dizajnirane ploče na čijem se dnu nalaze silicijumske membrane. Primenom vakuuma i zahvaljujući karakteristikama ovog rastvora (nizak pH, visoka jonska jačina) DNK se vezuje za membranu, a ostale komponente ćelije (membrane, proteini...) prolaze kroz kolonu i odbacuju se. Dodavanjem *BloodPrep DNA Wash Soution-a*, i primenom vakuuma u nekoliko uzastopnih koraka, DNK se dodatno prečišćava od ćelijskih ostataka. Na kraju, dodavanjem pufera *BloodPrep DNA Elution Soution 1 i 2*, visokog pH i niske jonske jačine, DNK se eluira sa membrane.

3.3. MERENJE KONCENTRACIJE DNK

Nakon izolacije meri se koncentracija i čistoća DNK molekula spektrofotometrijskom metodom. Kvantitativna analiza se zasniva na *Lambert-Beerovom* zakonu po kome apsorpcija svetlosti od strane nekog rastvora zavisi od koncentracije supstance u rastvoru, hemijske prirode supstance i od debljine sloja prolaska svetlosti.

$A = \epsilon \times d \times c$ (A – apsorbanca, tj. količina apsorbovanog zračenja, ϵ – molarni apsorpcioni koeficijent, d – dužina svetlosnog puta kroz rastvor, c – koncentracija rastvora) Potrebno je znati talasnu dužinu maksimuma apsorpcije date supstance λ_{\max} (za nukleinske kiseline je 260nm), pa se apsorbanca rastvora supstance meri primenom svetlosti talasne dužine koja odgovara maksimumu apsorpcije.

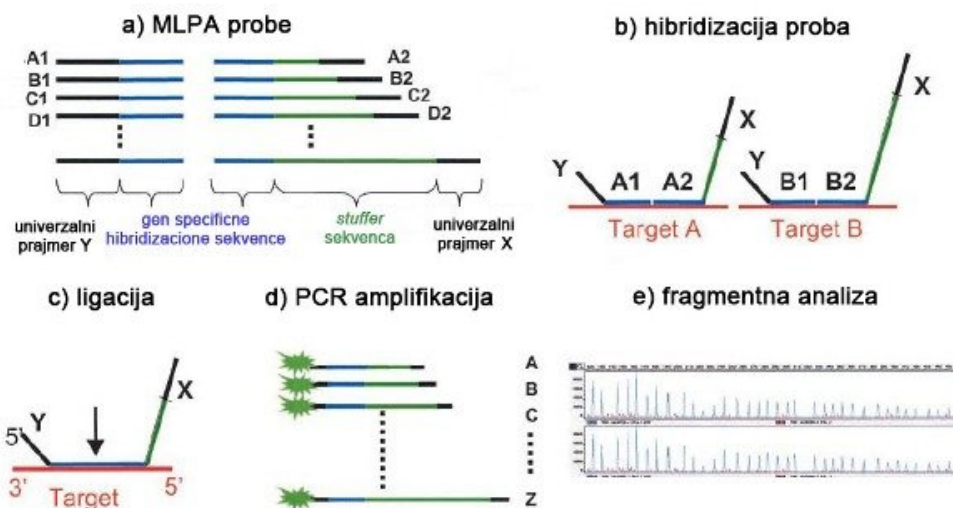
Merenje koncentracije i čistoće DNK radjeno je na *Shimadzu BioSpec-nano* UV/Vis spektrofotometru. Ovaj aparat omogućava kvantifikaciju nukleinskih kiselina i proteina, kao i fotometrijska merenja, u samo 1 μ L uzorka. Mikrolitarska zapremina uzorka se nanosi na kvarcno postolje na koje se, pri merenju, naslanja gornji kvarcni prozor. Oni zajedno prave dužinu optičkog puta od 0,2 mm u kome se vrši merenje. Za razliku od drugih aparata, *BioSpec-nano* ne koristi kivete za merenje nego se uzorak nanosi direktno na prozor na kome se merenje vrši. Kao blank se koristi voda ili pufer u kome je DNK rastvorena.

Uredjaj meri apsorbanču na 230, 260, 280 i 320 nm. EDTA, ugljeni hidrati i fenol apsorbuju svetlost na 230 nm, na 260 nm apsorbuju nukleinske kiseline (purinske i pirimidinske baze), a na 280 nm apsorbuju tirozinski i triptofanski ostaci proteina. Izmerena apsorbanca na ovim talasnim dužinama ukazuje na prisutvo kontaminacije u uzorku. Apсорbanca na 320nm se oduzima od vrednosti izmerene na 260nm i predstavlja korekciju u odnosu na zamućenost rastvora koja može dovesti do greške u merenju usled svetlosne interferencije. Velike vrednosti apsorpcije na 320nm mogu ukazivati na nespecifičnu kontaminaciju. Odnos A260/A280 vrednosti 1,7-2,0 ukazuje na čistu DNK koja nije kontaminirana proteinima. Odnos A260/A230 trebalo bi da bude približne vrednosti kao i A260/A280 odnos ($\geq 1,8$). Niže vrednosti ukazuju na prisustvo organskih komponenti (fenol, ugljeni hidrati....).

3.4. MULTIPLEKS LIGACIONO ZAVISNA AMPLIFIKACIJA PROBA

Multipleks ligaciono zavisna amplifikacija proba (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*- MLPA®) je visoko propusna metoda dizajnirana da detektuje promene broja kopija genomskih DNK sekvenci u samo jednoj multipleks PCR reakciji. MLPA reakcija rezultira u nastanku velikog broja amplifikacionih fragmenata dužina od 100 do 500 nukleotida koji se razdvajaju i kvantifikuju kapilarnom elektroforezom.

U osnovi MLPA tehnike leži umnožavanje (PCR-om) specifično dizajniranih proba koje hibridizuju za komplementarne sekvence DNK u uzorku koji se ispituje. Svaka MLPA proba se sastoji od dva oligonukleotida koja se vezuju za komplementarne regione na DNK ukoliko je ciljna sekvenca prisutna u uzorku DNK koji se ispituje. Dizajnirani su tako da se parovi nukleotida vezuju za matricu u neposrednoj blizini, što dalje omogućava njihovo povezivanje termostabilnom ligazom. Tako formirana proba predstavlja matricu koja se eksponencijalno umnožava PCR-om. Struktura proba i amplifikacionih produkata direktno oslikava sekvencu DNK uzorka koji se ispituje. Sve probe imaju identične sekvence na 5' i 3' krajevima što omogućava njihovu simultanu amplifikaciju u jednoj PCR reakciji, koristeći samo jedan par prajmera. Probe se međusobno razlikuju u dužini centralnog dela (eng. *stuffer* sekvenca) koji je karakterističan za svaku probu, i omogućava identifikaciju i razdvajanje različitih amplikona. Svaka proba produkuje amplifikacioni produkt jedinstvene dužine, što oslikava prisustvo ciljne sekvence u uzorku koji se ispituje. Produkti amplifikacije se razdvajaju i analiziraju kapilarnom elektroforezom (Slika 15). U cilju vizuelizacije produkata reakcije, jedan od prajmera se fluorescentno obeležava. Rezultujući hromatogram pokazuje fragmente razdvojene po dužini. Visina pika svakog amplifikacionog produkta predstavlja količinu detektovane fluorescencije, tj. količinu amplifikovanog produkta koji direktno reflektuje broj kopija ciljne sekvence. Poređenje elektroforetskih profila testiranog u odnosu na kontrolni uzorak omogućava detekciju delecija ili duplikacija regiona od interesa.



Slika 15. Šematski prikaz MLPA metode

Holandska kompanija *MRC-Holland* je razvila MLPA kitove koji se mogu koristiti u prenatalnoj i postnatalnoj hromozomskoj analizi, istraživanju naslednih karcinoma, karakterizaciji tumora, farmakogenetici, relativnoj kvantifikaciji iRNK, kao i analizama metilacionog statusa. Ova analiza zahteva minimum od samo 20 ng humane DNK (3000 ćelija) i može se koristiti i za delimično degradovanu DNK.

3.4.1. Detekcija velikih genskih rearanžmana u *BRCA1* i *BRCA2* genima MLPA metodom

Za detekciju velikih genskih rearanžmana (delecija ili duplikacija celih egzona) u *BRCA1* genu korišćen je *SALSA[®] MLPA[®] probemix P002-C2 BRCA1* kit. Ovaj kit sadrži 35 proba komplementarnih svim egzonima *BRCA1* gena, kao i 9 kontrolnih proba komplementarnih drugim humanim genima na različitim hromozomima koje služe za proveru količine i kvaliteta DNK uzorka. Ovaj kit je dizajniran tako da detektuje velike delecije/duplikacije jedne ili više sekvenci *BRCA1* gena u DNK uzorku.

Za detekciju velikih genskih rearanžmana (delecija ili duplikacija celih egzona) u *BRCA2* genu korišćen je *SALSA[®] MLPA[®] probemix P045-B1 BRCA2/CHEK2* kit. Ovaj kit sadrži probe za sve egzone *BRCA2* gena pri čemu su po dve probe dizajnirane za egzone 1,

3, 27, i za veliki egzon 11. Ovaj kit sadrži i 8 kontrolnih proba za druge humane gene, kao i dve probe za sekvence neposredno ispred i iza *BRCA2* gena. U ovom kitu se nalaze i 3 probe za *CHEK2* gen.

Heterozigotne delecije daju 35-50% smanjenje visine vrha amplifikacionog produkta specifične probe. Ali i male mutacije i/ili polimorfizmi koji se nalaze vrlo blizu mesta gde se probe međusobno povezuju mogu takodje da rezultuju u smanjenju visine pika na elektroferogramu. Stoga je neophodno svaku suspektnu deleciju detektovanu jednim probnim miksom potvrditi nezavisnom MLPA reakcijom sa drugim miksom proba, ili drugom metodom.

U MLPA reakciji se koristi 50-100 ng genomske DNK koja se rastvara u TE puferu (10 mM Tris-HCl pH 8,2 + 0,1 mM EDTA). pH razblažene DNK podešava se na 8,0-8,5 u cilju sprečavanja depurinacije za vreme inicijalnog zagrevanja na 98°C. DNK se razblažuje u TE puferu do radnog štoka od 20ng/μL.

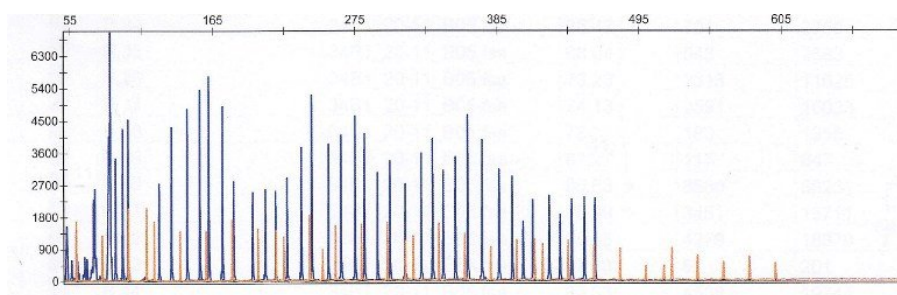
Prvi korak protokola je denaturacija DNK molekula 5 min na 98°C. Zatim sledi reakcija hibridizacije, gde se uzorcima dodaje hibridizacioni miks napravljen od MLPA pufera i miksa odgovarajućih proba. Hibridizacija se vrši 16-20 sati (preko noći) na 60°C. U ovom procesu se probe vezuju za komplementarne regione u DNK molekulu uzoraka. Zatim sledi reakcija ligacije, gde se uzorcima dodaje enzimski miks ligaza i pufera (15 min na 54 °C). Delovi proba se u ovom koraku povezuju jedni sa drugima. Sledeći korak je umnožavanje proba PCR reakcijom po preporuci proizvođača (Tabela 8).

Tabela 8. Temperaturni profil MLPA amplifikacije proba

	broj ciklusa	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna elongacija	
60°C	35	95°C 30 s	60°C 30 s	72°C 60 s	72°C 20 min	15°C

Fragmenti nastali umnožavanjem MLPA proba se dalje razdvajaju po dužini kapilarnom elektroforezom u automatskom DNK sekvenatoru (*Applied Biosystems 3500*). Umnožene probe se mešaju sa dužinskim standardom (*GeneScanTM 600 LIZ Size Standard v2.0 Applied Biosystems*) i formamidom koji će posle denaturacije (2 min na 80°C) sprečiti

renaturaciju jednolančanih DNK molekula. Elektroforeza se odvija u POP7 polimeru na 10kV sa injekcionim vremenom od 15s na 1,6 kV (Slika 16).



Slika 16. Primer rezultata MLPA metode sa automatskog DNK sekvenatora

Prva analiza neobradjenih podataka obuhvata vizuelnu procenu karakteristika dobijenih signala. Vršiti se procena rasporeda vrhova i visine, kao i pozicije dužinskog standarda, a sve u cilju uočavanja problema koji mogu nastati usled različitih faktora kao što su razgradjen polimer, stare kapilare, ili formamid lošeg kvaliteta. Ukoliko su vrhovi ispod ili iznad nivoa fluorescencije koju aparat detektuje, delovi protokola se za takve uzorke ponavljaju. Vizuelnom ocenom posmatraju se i pozicija i visina kontrolnih fragmenata kao i reakcija koja je predstavljala negativnu kontrolu. Podaci koji prodju prvu evaluaciju dalje se analiziraju u *Coffalyser* programu. S obzirom da intenzitet fluorescencije može zavistiti od mnogih faktora (kvalitet boje kojom se obeležavaju prajmeri, varijabilnost izmedju kapilara, proces pipetiranja), u ovom programu se radi niz normalizacija, kako pojedinačnih pikova, tako i pikova jednih u odnosu na druge, da bi se ove varijacije svele na minimum. Kao krajnji rezultat se dobija elektroferogram sa odnosom intenziteta fluorescencije i dužine fragmenata. Visina pikova predstavlja relativan broj kopija amplifikovanih proba, pa povećanje ili smanjenje visine u odnosu na kontrolu direktno ukazuje na postojanje duplikacije ili delecije regiona u DNK uzorka za koji je ta proba komplementarna.

3.5. ALELSKI SPECIFIČNI PCR

Ovo je specifični oblik PCR reakcije koji se koristi za detekciju malih promena u DNK tipa insercija i delecija samo jedne baze, ili zamene pojedinačnih nukleotida. U ovoj

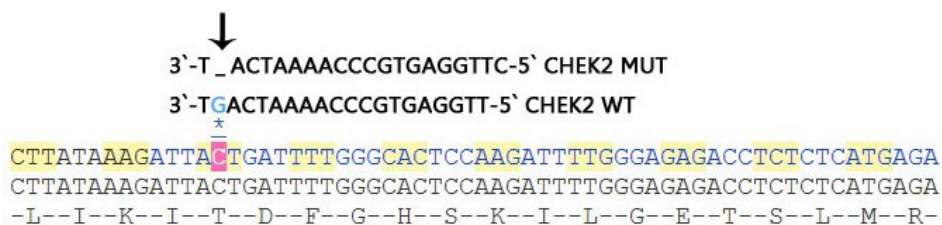
reakciji se koriste prajmeri dizajnirani tako da su komplementarni jednom od mogućih alela koji se ispituju. Nakon vezivanja prajmera za matricu DNK, polimeraza nastavlja polimerizaciju samo sa alela za koji je 3' kraj prajmera komplementarno vezan za matricu. Ukoliko između matrice i prajmera postoji nekomplementarno sparana baza na 3' kraju prajmera ili u njegovoj blizini, polimeraza ne može da se veže i da započne elongaciju. Prajmeri se dizajniraju tako da se dobijaju produkti različitih dužina koji se analiziraju elektroforezom na gelu na osnovu čega se može utvrditi koji je alel prisutan u DNK uzorku.

3.5.1. Detekcija *CHEK2* 1100delC mutacije alelski specifičnim PCR-om

U procesu analize *CHEK2* gena korišćen je alelski specifični PCR sa tri prajmera dizajnirana specijalno za detekciju 1100delC mutacije u ovom genu (Tabela 9). *CHEK2* WT prajmer vezuje se za *wt* DNK, *CHEK2* MUT vezuje se za DNK lanac koji ima mutaciju, i *CHEK2* C prajmer koji je univerzalan i vezuje se za DNK bez obzira na prisustvo mutacije jer se hibridizuje na udaljenom mestu (Slika 17).

Tabela 9. Sekvence prajmera za detekciju *CHEK2* 1100delC alelski specifičnim PCR-om

<i>CHEK2</i> WT	5'-TTGGAGTGCCCAAATCAGT-3'
<i>CHEK2</i> MUT	5'-CTTGGAGTGCCCAAATCAT-3'
<i>CHEK2</i> C	5'-CTGATCTAGCCTACGTGTCT-3'



Slika 17. Pozicija prajmera za alelski specifični PCR za detekciju 1100delC mutacije u *CHEK2* genu

Ukoliko bi se radio multipleks PCR sa sva tri prajmera u reakciji, mutirani alel i *wt* alel bi se razlikovali za samo 1 nukleotid (delecija citozina), što se na gelovima ne bi moglo razlikovati. Da bi se detektovalo prisustvo mutacije, radjene su dve odvojene PCR reakcije za svaki uzorak. Uslovi oba PCR su bili identični (Tabela 10), razlikovali su se samo po vrsti prajmera u reakcijama. Prva je sadržala prajmere specifične za *wt* alel (C+WT) dok je druga sadržala prajmere koji će umnožiti mutirani alel (C+MUT). Uzorak koji sadrži mutaciju 1100delC u heterozigotnom stanju korišćen je kao pozitivna kontrola reakcije i analiziran je na isti način kao i drugi uzorci sa dve paralelne PCR reakcije.

Tabela 10. Komponente PCR smeše za detekciju 1100delC *CHEK2* gena

Komponente	Finalno	Zapremina (µL)
<i>AmpliTaq Gold PCR Master Mix</i>	1x	10
Prajmer- C	5 pmol	1
Prajmer- WT, MUT	5 pmol	1
Genomska DNK	200 ng	*
Voda		**
Ukupno		20 µL

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

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

PCR je radjen u aparatu *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* (Tabela 11).

Tabela 11. Uslovi alelski specifičnog PCR-a za detekciju 1100delC *CHEK2* mutacije

inicijalna denaturacija	broj ciklusa	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna elongacija
95°C 8 min	35	95°C 35 s	62°C 30s	72°C 30 s	72°C 7 min

Uspešnost PCR reakcije i utvrđivanje prisustva mutacije ispitivano je elektroforezom na 2% agaroznom gelu (25 min, 25 mA). Ako je uzorak *wt* za *CHEK2* 1100delC mutaciju, amplifikacija se dešava samo u onoj tubici gde su prisutni C+WT prajmeri, ako je uzorak pozitivan za ovu mutaciju u homozigotnom stanju, umnožiće se DNK samo u onoj tubici gde se nalaze C+MUT prajmeri što će da daje jednu traku na gelu.

Ukoliko je uzorak heterozigot za 1100delC mutaciju, amplifikacija će se desiti u obe tubice pa će se na gelu videti dve trake.

3.5.2. Detekcija *CHEK2* Del5395 mutacije alelski specifičnim PCR-om

Veliku deleciju 9. i 10. egzona *CHEK2* gena (5395 baznih parova) detektovali smo multipleks alelski specifičnim PCR-om u kome smo koristili 2 para specifično dizajniranih prajmera (Tabela 12).

Tabela 12. Sekvence prajmera za detekciju *CHEK2* Del5395 alelski specifičnim PCR-om

CHLdel2F	5'- TGTAATGAGCTGAGATTGTGC -3'
CHLc2R	5'- CAGAAATGAGACAGGAAGTT -3'
CHLdelR	5'- GTCTCAAACCTGGCTGCG -3'
CHLcF	5'- CTCTGTTGTGTACAAGTGAC -3'

Prvi par prajmera (CHLdel2F i CHLc2R) okružuje mesto prekida u intronu 8. Drugi par (CHLdelR i CHLcF) okružuje mesto prekida u intronu 10. Količina komponenti PCR-a i uslovi reakcije su prikazani u Tabelama 13 i 14. Uzorak koji je heterozigot za mutaciju Del5395 u *CHEK2* genu, prethodno sekvenciran da bi se potvrdilo prisustvo mutacije, je korišćen kao pozitivna kontrola. Uspešnost PCR reakcije i prisustvo mutacije je utvrđivano elektroforezom na 3% agaroznom gelu (50 min, 25 mA).

Tabela 13. Komponente PCR smeše za detekciju Del5395 *CHEK2* gena

Komponente	Finalno	Zapremina (μL)
<i>AmpliTaq Gold PCR Master Mix</i>	1x	10
Prajmeri- CHLdel2F, CHLc2R	5 pmol	1
Prajmeri- CHLdelR, CHLcF	8 pmol	1
Genomska DNK	200 ng	*
Voda		**
Ukupno		20 μL

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

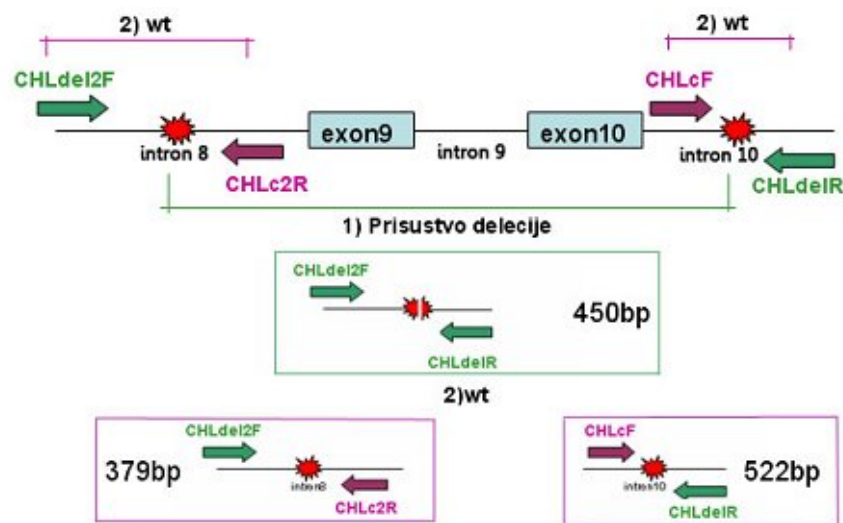
** Voda se dodaje u odgovarajućoj zapremini tako da je ukupna zapremina reakcione smeše 20 μl

Tabela 14. Uslovi alelski specifičnog PCR-a za detekciju Del5395 *CHEK2* mutacije

inicijalna denaturacija	broj ciklusa	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna elongacija
94°C 10 min	9	94°C 25 s	68°C-55,4°C 25s*	72°C 30 s	72°C 7 min
	31	94°C 25 s	55°C 30 s	72°C 35 s	

* temperatura hibridizacije je niža za 1,4°C u svakom narednom ciklusu – *touchdown PCR*

Kod uzoraka negativnih za mutaciju Del5395 umnožiće se samo dva fragmenta od 379 bp (CHLdel2F+CHLc2R) i 522 bp (CHLcF+CHLdeIR). CHLdel2F i CHLdeIR prajmeri su u ovom slučaju dosta udaljeni jedan od drugog i neće dati PCR produkt. Međutim, u prisustvu delecije, pored toga što ova dva prajmera hibridizuju na bliskim pozicijama na DNK matricu, i druga dva prajmera CHLc2R i CHLcF ne mogu da se vežu za svoje komplementarne delove jer ih je delecija uklonila. U ovom slučaju, kao produkt PCR-a nastaje samo jedan fragment dužine 450bp. Stoga će *wt* homozigot pokazivati dve trake na gelu (379bp i 522bp), heterozigot će imati 3 trake (379bp, 522bp- poreklom od *wt* alela i 450bp- poreklom od mutiranog alela) i homozigot za Del5395 mutaciju će imati samo jednu traku od 450bp jer će oba alela imati deleciju (Slika 18).



Slika 18. Šematski prikaz alelski specifičnog PCRa za detekciju Del5395 mutacije u *CHEK2*

3.6. ELEKTROFOREZA NA AGAROZNOM GELU

Naelektrisani molekuli nukleinskih kiselina se u električnom polju, u porama agaroznog gela razdvajaju po veličini. U fiziološkim uslovima fosfatne grupe u DNK su negativno naelektrisane, pa se molekul DNK kreće ka anodi. Manji molekuli putuju brže kroz gel i migriraju dalje od većih fragmenata koji se sporije kreću. Veća koncentracija agaroze u gelu povećava gustinu gela i omogućava razdvajanje kraćih fragmenata.

Produkti amplifikacije svih PCR produkata korišćenih u eksperimentima analiziraju se na 2% (ili 3%) agaroznom gelu koji sadrži 1,2g (ili 1,8g) agaroze, 60mL 0,5xTBE (pH=8,0: 108g Tris, 55g borne kiseline i 40mL 0,5M EDTA) i 3 μ L EtBr (iz štoka rastvorenog u vodi u koncentraciji 10mg/mL do finalne koncentracije 0,5 μ g/mL). EtBr je interkalirajući agens koji omogućava vizuelizaciju DNK molekula na gelu. Sve komponente se zagrevaju na magnetnoj mešalici do ključanja, rastvor se hladi do oko 60°C, 30ml se naliva u kadicu sa češljevima i ostavlja da polimeriše na sobnoj temperaturi. Nakon polimerizacije, kadica se stavlja u aparaturu za elektroforezu i dodaje se puffer 0,5xTBE. Uzorci se nalivaju zajedno sa bojom 6x ksilencijanol (0,25%) u 30% glicerolu u vodi (boja služi da poveća gustinu uzorka i spusti DNK na dno bunarića, kao i da se može pratiti elektroforeza i putovanje uzoraka kroz gel). Elektroforeza teče 25min (ili 50min) pri konstantnoj jačini struje od 25mA. Dobijene trake se posmatraju na UV transiluminatoru (EtBr fluorescira pod UV svetlom). Dužine traka se određuju na osnovu DNK markera.

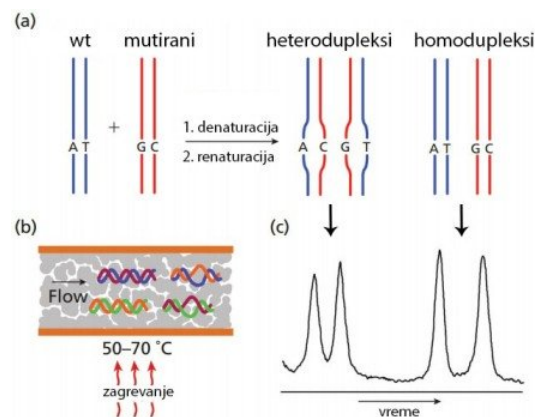
3.7. DENATURISUĆA TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI

Denaturišuća tečna hromatografija visokih performansi (eng. *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*- DHPLC) je metoda koja olakšava i ubrzava visoko propusno skeniranje varijanti nukleotidne sekvence u DNK. Često se koristi da identifikuje zamenu samo jednog nukleotida, kao i male insercije/delecije u DNK. Fragmenti genomske DNK, veličina između 150 i 600 baznih parova (bp), se umnožavaju PCR-om praćenim denaturacijom, pa zatim i renaturacijom PCR produkata, u cilju stvaranja potencijalnih

heterodupleksa, odnosno pogrešno sparenih baza u uzorcima koji su heterozigoti za mutirani alel.

U prisustvu mutacije na jednom od dva alela, nakon renaturacije se formiraju ne samo originalni homodupleksi već simultano nastaju i termički manje stabilni heterodupleksi (Slika 19). Manja stabilnost kao i GC sastav, utiču na kraće zadržavanje odnosno brže eluiranje ovakvih fragmenta sa kolone. Hemijski i fizički inertnu stacionarnu fazu čine neporozne poli stiren-divinil-benzenske čestice dijametra 2-3 μ m. Ovakva stacionarna faza je elektroneutralna i hidrofobna. DNK je sa svojim fosfatnim grupama negativno naelektrisana, i kao takva se ne može vezati za kolone matriksa. Molekul koji joj omogućuje adsorpciju za stacionarnu fazu je trietil-amonijum-acetat (TEAA) koji zajedno sa DNK čini mobilnu fazu. Pozitivno naelektrisani amonijum joni TEAA molekula interaguju sa negativnim fosfatnim grupama DNK, dok u isto vreme njegovi alkil lanci interaguju sa hidrofobnom površinom stacionarne faze. Vezana DNK se eluira povećanjem koncentracije organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Eluirani DNK fragmenti se detektuju UV apsorbcijom na 254 nm.

Povećanjem temperature iznad 50°C, usled prisustva pogrešno sparenih baza, heterodupleksi će se mnogo ranije denaturisati nego stabilni homodupleksi sa ispravno sparenim bazama. To za posledicu ima njihovo kraće zadržavanje i brže eluiranje sa kolone što će se na elektroferogramu videti kao dodatni pikovi (Slika 19). U slučaju da ne postoji promena u DNK, DHPLC profil će pokazati samo jedan profil. Heterozigotni uzorak za neku promenu može da pokaže do 4 pika koji predstavljaju dva tipa heterodupleksa i dva tipa homodupleksa prisutnih nakon renaturacije PCR produkata. Sve profile koji odstupaju od jednog pika treba sekvencirati da bi se utvrdilo koja je mutacija u pitanju.



Slika 19. Princip DHPLC metode

Prvi korak eksperimentalnog dela analize *RAD51C* gena DHPLC-om odnosi se na umnožavanje 9 kodirajućih egzona *RAD51C* gena. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju su prikazani u Tabeli 15, u Tabeli 16 su date komponente PCR smeše, a u Tabeli 17 je predstavljen temperaturni profil PCR reakcije za svaki egzon.

Tabela 15. Sekvence prajmera za amplifikaciju kodirajućeg regiona *RAD51C* gena

Egzon	Uzvodni prajmer (5'-3')	Nizvodni prajmer (5'-3')	PCR produkt	T ^a
1	TACAAGACTGCGCAAAGCTG	AGCAGAATCTAACGGAGACTGG	400	58
2	TCCACTCCTAGCATCACTGTT	CCCACCCCTAAAAGGAGAAC	400	58
3	TCATGATTTGGTTGTTTGTCATC	GGTCTCAGATGGGCACAAAT	274	60
4	TGCCAATACATCCAAACAGG	TCATGCTTATCAAACACCTCAA	249	60
5	TCTTGGAGAGAGAGAGCATT	CAGGCAAACGCTATTTTGAC	300	60
6	TGGGGTTTCACAATCTTGG	GTCTGCTTTCATGAAGCGTATAGT	250	60
7	CCAAGTCAGTAAGGCCATATACA	TCAGACAAGGCAACAAAAGTG	244	60
8	ACGGGTAATTTGAAGGGTGT	AGCATCAAAGCTGTCTCTCA	363	62
9	GCCTGGCCCTAGAATAAAGTA	GGTATTTTCCCATTCACTTCA	357	62

T^a- temperature hibridizacije prajmera

Tabela 16. Spisak komponenti PCR smeše za za amplifikaciju kodirajućeg regiona *RAD51C*

Komponente	Zapremina (μL)
Pufer (<i>Applied Biosystems 10x</i>)	2,5 μL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 μL
dNTP-ovi (1,25 mM)	4 μL

Uzvodni prajmer (100 μ M)	0,2 μ L
Nizvodni prajmer (100 μ M)	0,2 μ L
Taq polimeraza (<i>Applied Biosystems</i>) 5U/ μ L	0,2 μ L
Genomska DNK	*
Voda	**
Ukupno	25 μ L

* Zapremina rastvora genomske DNK koja je potrebna za reakciju određuje se na osnovu izmerene koncentracije izolovane DNK. Finalna koncentracija DNK potrebna za reakciju je 200ng.

** Voda se dodaje u odgovarajućoj zapremini tako da je ukupna zapremina reakcione smeše 25 μ L

Tabela 17. Uslovi PCR-a za umnožavanje egzona *RAD51C* gena

inicijalna denaturacija	broj ciklusa	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna elongacija	topljenje	renaturacija
94°C 5 min	35	94°C 45 s	T ^a *	72°C 1 min	72°C 7min	95°C 10 min	65°C 60min

*T^a - temperatura zavisi od temperature hibridizacije svakog prajmera

Nakon PCR-a, finalne denaturacije i renaturacije lanaca, uzorci su analizirani DHPLC metodom na WAVE HT sistemu (*Transgenomic, Omaha, NE, USA*), a rezultati su obradjivani NavigatorTM programom (*Transgenomic*). Svi uzorci koji su odstupali od uobičajenog DHPLC profila dalje su sekvencirani za potvrdu prisustva i identifikaciju mutacije. Efekat svih detektovanih varijanti procenjivan je *in silico* kompjuterskim alatima: SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) i CONDEL (<http://bg.upf.edu/condel/home>).

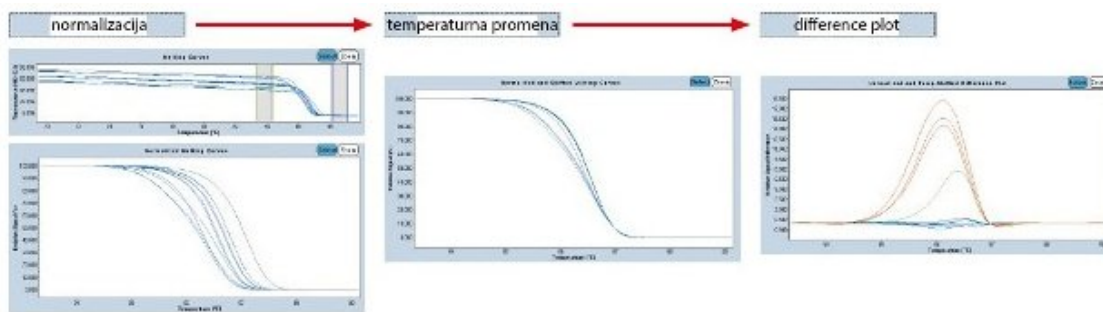
3.8. ANALIZA KRIVE TOPLJENJA VISOKE REZOLUCIJE

Analiza krive topljenja visoke rezolucije (eng. *High Resolution Melting- HRM*) je metoda koja omogućava analizu genskih varijacija (polimorfizama, mutacija, metilacija) u PCR produktima. HRM karakteriše uzorke nukleinskih kiselina na osnovu njihovih krivi

topljenja. Trenutno najznačajnija upotreba ove metode je u genskom skeniranju, tj. utvrđivanju prisustva nepoznatih genskih varijacija u PCR amplifikatima pre sekvenciranja, ili kao njegova alternativa. Varijacije u sekvencama se lako detektuju jer dovode do promene izgleda krive topljenja DNK.

U HRM eksperimentima se ciljna sekvenca umnožava PCR-om u prisustvu visoko saturišućih fluorescentnih boja (npr. *LightCycler*[®] 480 *ResoLight Dye*) koje fluoresciraju samo kada su vezane za dvolančanu DNK. Promena fluorecencije se može iskoristiti za merenje povećanja koncentracije DNK u realnom vremenu za vreme PCR-a (porast fluorecencije), ili za merenje topljenja DNK (denaturacije lanaca) indukovano povećanjem temperature (smanjenje fluorecencije). Nakon PCR-a amplikoni se na kratko denaturišu visokom temperaturom a zatim se lagano renaturišu postepenim smanjenjem temperature. Ako je DNK uzorak heterozigot za određenu promenu, pored savršeno sparenih homodupleksa nastaju u heterodupleksi koji u sebi sadrže pogrešno sparene baze. Tako nastali heterodupleksi su nestabilniji i tope se na nižim temperaturama u odnosu na potpuno komplementarne homoduplekse. Fluorescentni signal poreklom od heterozigotnog uzorka pokazuje topljenje na dve karakteristične temperature usled razlika u temperaturama topljenja homodupleksa i heterodupleksa koje sadrži.

U aparatu *LightCycler*[®] 480 II (*Roche Diagnostics GmbH, Germany*) sukcesivno se izvodi *real-time* PCR i HRM. Analiza dobijenih signala se radi *LightCycler*[®] 480 *Gene Scanning* programom koji normalizuje neobrađene podatke u tri koraka: normalizacija, temperaturno pomeranje i diferencijalni *plot*. U prvom koraku normalizacije, svi fluorescentni signali sa početka (inicijalni, pre topljenja) i kraja reakcije (finalni, nakon topljenja) se podešavaju uniformno na skali od 0% do 100%. U drugom koraku se temperaturna osa normalizovanih krivih topljenja pomera do tačke gde su sve dsDNK kompletno denaturisane. Razlika u izgledu krivi topljenja se dalje analizira oduzimanjem od referentne krive. Ovo pomaže automatskom grupisanju uzoraka u grupe sa sličnim krivama topljenja (npr. heterozigoti naspram homozigota). Kao rezultat se dobijaju grafikoni (*difference plot*) gde se uzorci grupišu na osnovu sličnog oblika krive topljenja (Slika 20).



Slika 20. Normalizacija signala HRM metodom

3.8.1. Detekcija mutacija u *TP53* genu HRM metodom

Utvrđivanje prisustva mutacija u 8. egzonu *TP53* gena kod ranog karcinoma dojke (≤ 40 godina), izvedeno je na LightCycler[®] 480 II aparatu, pri čemu su sve reakcije rađene u duplikatu. DNK izolovana iz ćelijske linije karcinoma dojke MCF-7, predstavljala je homozigotnu *wt* kontrolu koja je prethodno sekvencirana. Kao pozitivna kontrola korišćen je DNK uzorak sa mutacijom 14493G>T u 8. egzonu *TP53* gena, prethodno potvrđena sekvenciranjem. Kao NTC kontrola (eng. *Non Template Control*), koja ukazuje na eventualnu kontaminaciju reagenasa u reakciji, korišćena je sterilna voda. Prajmeri za analizu 8. egzona *TP53* gena dati su u Tabeli 18.

Tabela 18. Sekvence prajmera za amplifikaciju 8. egzona *TP53* gena

TP53ex8F	5'- TAAATGGGACAGGTAGGACC -3'
TP53ex8R	5'- TCCACCGCTTCTTGTCCTGC-3'

Svaka reakciona smeša se sastojala od 50-100 ng DNK matrice, 250 nM prajmera (0,5 μ L), 5 μ L *LightCycler HRM Master Reaction Mix-a* (Roche, Germany), 3 mM MgCl₂ (1,2 μ L) i sterilne vode do ukupne zapremine od 10 μ L.

Vremenski i temperaturni profil reakcije je bio sledeći:

PCR: inicijalna denaturacija: 95°C/10min
 45 ciklusa: 95°C/10s, *touchdown** 64°C - 54°C/10s
 (1°C/ciklusu), 72°C/20s

Denaturacija:	95°C/1min
Hlađenje:	40°C/1min
HRM:	65°C - 95°C sa povećanjem od 1°C/s uz 25 akvizicija/°C
Finalno hlađenje:	40°C/10s

3.8.2. Detekcija mutacije 657del5 u *NBS1* genu HRM metodom

Utvrđivanje prisustva delecije 5 nukleotida u 6. egzonu *NBS1* gena (657del5) izvedeno je na LightCycler® 480 II aparatu, pri čemu su sve reakcije rađene u duplikatu. Kao pozitivna kontrola je korišćena heterozigotna sekvenca DNK za ovu mutaciju, prethodno potvrđena sekvenciranjem. Kao NTC kontrola je korišćena sterilna voda. Prajmeri za analizu 6. egzona *NBS1* gena dati su u Tabeli 19.

Tabela 19. Sekvence prajmera za amplifikaciju 6. egzona *NBS1* gena

NBS1F	5' - TGATCTGTCAGGACGGCAG -3'
NBS1R	5' - CATAATTACCTGTTTGGCATTC -3'

Svaka reakciona smeša se sastojala od 50 ng DNK matrice, 400 nM prajmera (0,5 µL), 10 µL *LightCycler HRM Master Reaction Mix-a* (Roche, Germany), 3,5 mM MgCl₂ (2,8 µL) i sterilne vode do ukupne zapremine od 20 µL.

Vremenski i temperaturni profil reakcije je bio sledeći:

PCR:	inicijalna denaturacija: 95°C/10 min
	45 ciklusa: 95°C/10s, <i>touchdown</i> * 64°C - 50°C/10s (1°C/ciklusu), 72°C/20s
Denaturacija:	95°C/1min
Hlađenje:	40°C/1min
HRM:	65°C - 95°C sa povećanjem od 1°C/s uz 25 akvizicija/°C
Finalno hlađenje:	40°C/10s

3.9. ANALIZA POLIMORFIZMA DUŽINE RESTRIKCIONIH FRAGMENTA

Ova metoda (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphisms*- RFLP) se bazira na korišćenju enzima restrikcionih endonukleaza koji imaju sposobnost da prepoznaju specifičnu sekvencu nukleotida (restrikciono mesto) u dvolančanoj DNK, i da katalizuju hidrolizu DNK molekula na mestu prepoznavanja. Prisustvo mutacije u DNK može da ukine postojanje restrikcionog mesta ili da stvori novo. U zavisnosti od sekvence, (prisustva ili odsustva mutacije) biće različita dužina fragmenata posle tretiranja restrikcionim endonukleazama. RFLP analiza se koristi za detekciju polimorfizama restrikcionih mesta (eng. *Restriction Site Polymorphisms*- RSP) i sastoji se od amplifikacije regiona od interesa (PCR), tretiranje amplifikovanih produkata odgovarajućom restrikcionom endonukleazom (restrikciona digestija), elektroforetskog razdvajanja dobijenih fragmenata, vizuelizacije i analize rezultata.

3.9.1. Detekcija *RAD51* 135G>C polimorfizma RFLP metodom

Prisustvo polimorfizma nukleotidne sekvence (eng. *Single Nucleotide Polymorphism*- SNP) u 5'UTR regionu *RAD51* gena određuje se amplifikacijom regiona od 157 baznih parova oko nukleotida 135. Ovaj region sadrži restrikciono mesto za *MvaI* enzim (*Thermo Scientific*) koje se ukida kod 135C alela. 135G aleli se razlažu *MvaI* enzimom dajući produkte dužina 86 i 71 bazni par. 135C alel se ne razlaže ovim enzimom i daje samo jedan produkt dužine 157 baznih parova. Prajmeri koji se koriste u PCR reakciji, komponente PCR smeše i uslovi PCR-a dati su u Tabelama 20, 21 i 22.

Tabela 20. Sekvence prajmera za amplifikaciju 5'UTR regiona *RAD51* gena

RAD51F	5'-TGGGAACTGCAACTCATCTGG-3'
RAD51R	5'-GCGCTCCTCTCTCCAGCAG-3'

Tabela 21. Komponente PCR smeše za detekciju *RAD51* 135G>C polimorfizma

Komponente	Finalno	Zapremina (μL)
<i>Fermentas DreamTaq</i> [®] <i>PCR Master Mix 2x</i>	1x	10
Prajmer- RAD51F	8 pmol	1
Prajmer- RAD51R	8 pmol	1
Genomska DNK	200 ng	*
Voda		**
Ukupno		20 μL

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

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

Tabela 22. Uslovi PCR reakcije za detekciju *RAD51* 135G>C polimorfizma

inicijalna denaturacija	broj ciklusa	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna elongacija
94°C 3 min	35	94°C 60 s	54°C 30 s	72°C 40 s	72°C 7 min

Uspešnost PCR reakcije se proverava elektroforezom na 2% agaroznom gelu (6,5 μL PCR produkta + 1,5 μL boje ksilen-cijanol, 25 mA, 25 min). PCR produkti se kvantifikuju i postavlja se smeša za restrikcionu digestiju *MvaI* enzimom po preporuci proizvođača.

Isečeni produkti se zatim razdvajaju na 8% poliakrilamidnom gelu na 100V (3 mA, 3 W), 1h 30 min. S obzirom da pufer za digestiju u sebi sadrži boju, uzorci se nanose direktno na gel. Kao dužinski marker se koristi *O'GeneRuler*[™] *Ultra Low Range DNA Ladder*, *Fermentas* (0,5 μL markera+ 3 μL boje + 15,5 μL vode). Gel se boji srebrom i identifikuju se trake.

3.9.2. Detekcija *TP53* Arg72Pro (R72P) polimorfizma RFLP metodom

Polimorfizam egzona 4 *TP53* gena detektuje se RFLP metodom. Ovaj polimorfizam kodira ili arginin (CGC) ili prolin (CCC) dajući tri varijantne forme: Arg/Arg, Arg/Pro i Pro/Pro (RR, RP i PP). PCR-om se umnožava 296 baznih parova dugačak region egzona 4 *TP53* gena. PCR produkti se razlažu *Bsh1236I* restrikcionim enzimom (*Thermo Scientific*). Arg alel se razlaže enzimom i daje produkte dužina 126 i 170 baznih parova, dok Pro alel ostaje neisečen i daje samo jedan fragment dužine 296 baznih parova. Prajmeri za PCR reakciju, komponente PCR smeše i uslovi PCR-a dati su u Tabelama 23, 24 i 25.

Tabela 23. Sekvence prajmera za amplifikaciju 4. egzona *TP53* gena

TP534F	5'- ATCTACAGTCCCCCTTGCCG -3'
TP534R	5'- GCAACTGACCGTGCAAGTCA -3'

Tabela 24. Komponente PCR smeše za amplifikaciju 4. egzona *TP53* gena

Komponente	Finalno	Zapremina (µL)
<i>Fermentas DreamTaq[®] PCR Master Mix 2x</i>	1x	10
Prajmer- TP534F	5 pmol	1
Prajmer- TP534R	5 pmol	1
Genomska DNK	300 ng	*
Voda		**
Ukupno		20 µL

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

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

Tabela 25. Uslovi PCR reakcije amplifikaciju 4. egzona *TP53* gena

inicijalna denaturacija	broj ciklusa	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna elongacija
95°C 3 min	35	95°C 30 s	58°C 30 s	72°C 40 s	72°C 10 min

Uspešnost PCR reakcije se proverava elektroforezom na 2% agaroznom gelu (6,5 µL PCR produkta + 1,5 µL boje ksilen-cijanol, 25 mA, 25 min). PCR produkti se kvantifikuju i postavlja se smeša za restrikcionu digestiju *Bsh1236I* enzimom po preporuci proizvođača. Restrikcioni fragmenti su detektovani na aparatu 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*) po preporuci proizvođača.

3.9.3. Detekcija *XRCC1* Arg399Gln polimorfizma RFLP metodom

Supstitucija G>A u 10. egzonu *XRCC1* gena koja vodi zameni arginina u glutamin Arg399Gln (R399Q), detektuje se umnožavanjem regiona od 268 baznih parova. Ovaj region sadrži restrikciono mesto za *BcnI* enzim (*Thermo Scientific*). Arg aleli se razlažu *BcnI* enzimom dajući fragmente dužina 91 i 177 baznih parova. Gln alel se ne seče i daje samo jedan product dužine 268 baznih parova. Prajmeri koji se koriste u PCR reakciji, komponente PCR smeše i uslovi PCR-a dati su u Tabelama 26, 27 i 28.

Tabela 26. Sekvence prajmera za amplifikaciju 10. egzona *XRCC1* gena

XRCC1F	5'-CAAGTACAGCCAGGTCCTAG-3'
XRCC1R	5'- CCTTCCCTCATCTGGAGTAC-3'

Tabela 27. Komponente PCR smeše za amplifikaciju 10. egzona *XRCC1* gena

Komponente	Finalno	Zapremina (µL)
<i>Fermentas DreamTaq</i> [®] PCR Master Mix 2x	1x	10
Prajmer- XRCC1F	8pmol	1
Prajmer- XRCC1R	8pmol	1
Genomska DNK	300ng	*
Voda		**
Ukupno		20 µL

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

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

Tabela 28. Uslovi PCR reakcije za amplifikaciju 10. egzona *XRCC1* gena

inicijalna denaturacija	broj ciklusa	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna elongacija
94°C 5 min	32	94°C 60 s	58°C 30 s	72°C 40 s	72°C 7 min

Uspešnost PCR reakcije se proverava elektroforezom na 2% agaroznom gelu (6,5 µL PCR produkta + 1,5 µL boje ksilen-cijanolo, 25 mA, 25 min). PCR produkti se kvantifikuju i postavlja se smeša za restrikciju digestiju *BcnI* enzimom po preporuci proizvođača. Restrikcioni fragmenti su detektovani na aparatu 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*) po preporuci proizvođača.

3.10. ELEKTROFOREZA NA POLIAKRILAMIDNOM GELU

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (eng. *Polyacrlamide gel electrophoresis-PAGE*) služi za razdvajanje molekula DNK po dužini, u električnom polju. Prednost PAA gela u odnosu na agarozni je veća rezolucija i sposobnost razdvajanja kraćih fragmenata DNK. Visoko procentni PAA gelovi mogu napraviti razliku u dužini od samo 1 baznog para kod 1kb molekula.

PAA gelovi se formiraju polimerizacijom akrilamida u vodenom rastvoru u prisustvu N- N' metilenbisakrilamida. Kopolimerizacijom nastaje mreža koja se sastoji od lanaca akrilamida ispresecanih molekulima bisakrilamida koji formiraju pore različitih veličina. Uvodjenjem katalizatora, polimerizacija se odvija kroz prisustvo slobodnih radikala. Najčešći sistem katalitičke inicijacije koji se koristi uključuje produkciju slobodnih radikala od strane amonijum- persulfata (APS) u prisustvu alifatičnog amina N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin-a (TEMED). Prilikom pripreme gela određuje se njegova gustina, odnosno veličina pora, od čije veličine zavisi razdvajanje molekula DNK različitih veličina. Koncentrovaniji, gušći gel, bolje razdvaja bliske fragmente male dužine, dok ređi gel služi za razdvajanje velikih fragmenata.

Nakon elektroforeze, da bi se vizuelizovale trake DNK, gelovi se boje srebrom. Bojenje gela srebrom se zasniva na redukciji srebrnih katjona do nerastvornog srebrnog metala od strane nukleinskih kiselina. Redukovane srebrne granule se deponuju u gelu oko traka DNK, stvarajući latentnu sliku koja postaje vidljiva kada se gel potapa u rastvor srebrnih katjona i redukjućeg agensa. Srebrne granule koje već postoje u latentnoj slici dalje redukuju i deponuju srebro iz rastvora. Trake se vide kao tamno braon ili crni regioni. Razvijanje se zaustavlja kada se promeni pH do tačke kada redukcija srebra više nije favorizovana. Srebro nitrat (AgNO_3) je izvor jona srebra koje se redukuje do metalnog srebra. Natrijum karbonat (Na_2CO_3) podešava pH oko vrednosti 12, koja omogućava redukciju. Formaldehid (CH_2O) služi kao reduktant za prevođenje Ag^+ u Ag^0 , i u ovoj reakciji se oksiduje do mravlje kiseline. Natrijum tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) je izvor tiosulfatnog jona koji formira kompleks sa slobodnim jonom srebra i sprečava njegovu redukciju, time smanjujući bojenje pozadine.

Za analizu fragmenata DNK dobijenih digestijom restriktionim enzimima koristi se 8% PAA gel koji čine: 14,4mL dejonizovane vode, 6,65mL 30% poliakrilamid (akrilamid:bisakrilamid = 29:1), 1,25mL 10xTBE, 175 μL 10% APS i 10 μL TEMED.

Nakon elektroforeze (čiji uslovi zavise od dužine očekivanih fragmenata) gel se potapa u niz rastvora do finalnog bojenja traka. 10% etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)- 7 minuta, 1% azotna kiselina (HNO_3)- 3 minuta, destilovana voda- 2x1min, srebro nitrat (AgNO_3)- 30min u mraku, destilovana voda- 2x1min i na kraju, natrijum karbonat (Na_2CO_3) do pojave traka. Za čuvanje obojenih gelova, potopiti ih u 10% sirćetnu kiselinu (CH_3COOH) i isprati destilovanom vodom.

3.11. ELEKTROFOREZA NA *AGILENT 2100 BIOANALYZER* SISTEMU

Sistem elektroforeze na *2100 Bioanalyzer*-u je baziran na principima tradicionalne gel elektroforeze ali je pojednostavljen i prenet na formu čipa. Na čipu se nalaze bunarići predviđeni za nanošenje uzoraka, gela, kao i dužinskog markera. Čipovi su proizvedeni tako da sadrže mikro kanale utisnute na staklenu površinu koji stvaraju mrežu između bunarića. Za vreme pripreme čipa, mikro kanali se pune polimerom i fluorescentnom

bojom. Gel i boja se pod pritiskom razlivaju kroz kanale, a zatim se u bunariće nanose uzorci i dužinski marker. Kada je svaki bunarić adekvatno naliven, čip postaje električno kolo i elektrode aparata se uranjaju direktno u bunariće. Naelektrisani molekuli DNK se kreću u električnom kolu slično kao i u gel elektroforezi, i razdvajaju se po dužini kroz mrežu pora formiranih u polimeru. Kraći fragmenti migriraju brže nego duži. Boja se ugrađuje u DNK lance i vrši se detekcija laser-indukovanom fluorescencijom. Podaci se analiziraju slikama u obliku gelova (trake) ili elektroferograma (pikovi). Aparat pravi standardnu krivu vremena putovanja fragmenata poznatih dužina u odnosu na samu dužinu, i koristi je za određivanje dužine nepoznatih fragmenata na osnovu njihovog migracionog vremena. Dodatno, dva dužinska markera (gornji i donji) se kreću sa svakim uzorkom ograničavajući opseg detekcije. Takođe, na osnovu poznate koncentracije gornjeg markera, može se izračunati i koncentracija svakog uzorka.

3.12. AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK

Mutacije detektovane nekom od prethodno nabrojanih metoda potvrđuju se DNK sekvenciranjem. Na sličan način su i profili nepoznatih uzoraka koji su odstupali od kontrolnih profila bili sekvencirani, u cilju utvrđivanja tačne promene u DNK. Sekvenciranjem DNK molekula se dobija tačan redosled nukleotida u određenom regionu koji se može koristiti za utvrđivanje prisustva malih promena u DNK tipa zamena jedne baze, ili malih insercija/delecija. Sekvenca nepoznatog uzorka se poredi sa *wt* sekvencom i utvrđuje prisustvo promena.

Da bi uzorak bio spreman za sekvenciranje potrebno je uraditi njegovu pripremu koja se izvodi u nekoliko koraka. Prvo treba prečistiti PCR produkt, obeležiti ga fluorescentnim bojama u cilju detekcije, i prečistiti nakon bojenja.

3.12.1. Prečišćavanje PCR produkata *ExoI* i *SAP* enzimima

Prvi korak pripreme za sekvenciranje je prečišćavanje PCR produkata od preostalih prajmera, neugrađenih nukleotida, polimeraze, soli itd. Prečišćavanje se zasniva na

sposobnosti enzima *Exonuclease I* (Exo I) i *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP) da razgrade neugrađene prajmere (Exo I) i uklone fosfatne grupe sa dNTP-ova (SAP). U PCR produkt se dodaju oba enzima i zajedno se inkubiraju 15 min na 37°C. Inaktivacija enzima se vrši 15 min na 85°C.

3.12.2. Obeležavanje DNK pre sekvenciranja (*Cycle sequencing* reakcija)

Reakcija obeležavanja DNK pre sekvenciranja je u principu PCR reakcija u kojoj se osim standardnih dNTP-ova (deoksinukleotidi) koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi (ddNTP), pri čemu je svaki od ddNTP-ova obeležen jednom od četiri fluorescentne boje koje, nakon ekscitacije laserom, emituju svetlost određene talasne dužine. Za *cycle sequencing* reakciju koristi se *BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)* koji u sebi sadrži sve komponente. Jedino što se dodaje ovom kitu jeste prečišćen PCR produkt, kao i samo jedan od para prajmera koji je korišćen u PCR reakciji (po preporuci proizvođača). DNK polimeraza nasumično ugrađuje i dNTP-ove i ddNTP-ove u rastući lanac. Nakon ugradnje ddNTP-a, usled nedostatka 3'hidroksilne grupe na ddNTP-u, dolazi do terminacije sinteze lanca i taj fragment, na svom 3'kraju, ostaje obeležen bojom kojom je obeležen ugrađeni ddNTP. Kao rezultat celokupne reakcije nastaje smeša fragmenata DNK različitih dužina koji na svojim 3'krajevima sadrže obeležene ddNTP-ove.

3.12.3. Prečišćavanje produkata *cycle sequencing*-a *BigDye XTerminator Purification Kit*-om

Dobijeni fragmenti DNK nakon *cycle sequencing* reakcije prečišćavaju se od neugrađenih, bojama obeleženih ddNTP-ova, koji bi ometali pravilno određivanje sekvence ciljnog DNK molekula. U PCR produkt *cycle sequencing* reakcije dodaju se rastvori *XTerminator* i *SAM*. Uzorak se potom vorteksuje 30 min. Za to vreme, komponente rastvora *XTerminator* vezuju neugrađene ddNTP-ove, dNTP-ove i soli iz produkta *cycle sequencing* reakcije, dok rastvor *SAM* stabilizuje fragmente nakon prečišćavanja. Nakon

vorteksovanja, uzorak se centrifugira, pri čemu u supernatantu ostaje prečišćeni DNK produkt, dok su u talogu vezani neugrađeni ddNTP-ovi, soli i ostale nečistoće.

3.12.4. Sekvenciranje DNK

Prethodnom pripremom dobijena smeša fragmenata različitih dužina, specifično obeležena na svom 3' kraju, unosi se u automatski DNK sekvenator (*ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*). U ovom aparatu se kapilarnom elektroforezom fragmenti razdvajaju po dužini. Fragmenti pod uticajem električnog polja putuju kroz kapilaru ispunjenu polimerom, koji ima ulogu analognu ulogi gela u klasičnoj gel elektroforezi. Kraći fragmenti će putovati brže pa će pre stići do prozora za detekciju, prozirnog dela kapilare na njenom suprotnom kraju, gde će se eksčitovati laserskim zrakom. Pri vraćanju iz eksčitovanog u osnovno nepobuđeno stanje boja emituje svetlost određene talasne dužine koja je specifična za svaku od četiri boje kojima su obeleženi ddNTP-ovi. CCD kamerom (engl. *charge-coupled device* - CCD) detektuje se emitovana svetlost, a redosled i jačina tih signala memoriše u kompjuteru. Obradom podataka *Sequence Analysis* softverom dobija se redosled nukleotida početnog DNK molekula.

Dobijene sekvence se ispituju na prisustvo promena upotrebom BLAST programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), upoređivanjem sa sekvencama gena koje ne sadrže mutacije.

3.13. STATISTIČKE METODE

Ispitivanje povezanosti polimorfizama *TP53*, *RAD51* i *XRCC1* gena sa karakteristikama pacijentkinja i histopatološkim karakteristikama karcinoma radjeno je Fišerovim egzaktnim testom (eng. *Fisher exact test*) i χ^2 testom (eng. *Pearson Chi-square test*). χ^2 test je korišćen i za utvrđivanje razlika u distribuciji alela i genotipova između grupa pacijentkinja i kontrolne grupe. Vrednost $p < 0,05$ je korišćena kao kriterijum značajnosti. Odnos verovatnoća (eng. *Odds Ratio*- OR) i 95% intervali poverenja (eng. *Confidence intervals*- CI) su korišćeni u proceni doprinosa alelskih i genotipskih varijanti

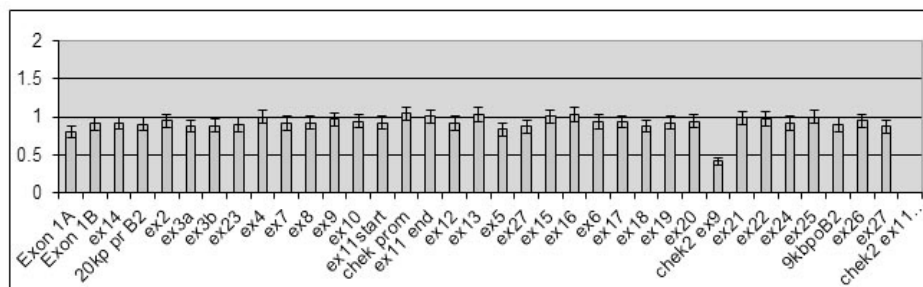
nastanku karcinoma dojke. OR pokazuje koliko je prisustvo vs. odsustvo neke varijante povezano sa prisustvom vs. odsustvom fenotipa (kancera). Odstupanja alelskih i genotipskih učestalosti od onih očekivanih prema Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži (eng. *Hardy-Weinberg equilibrium*) ocenjivano je korišćenjem standardnog χ^2 testa.

4. REZULTATI

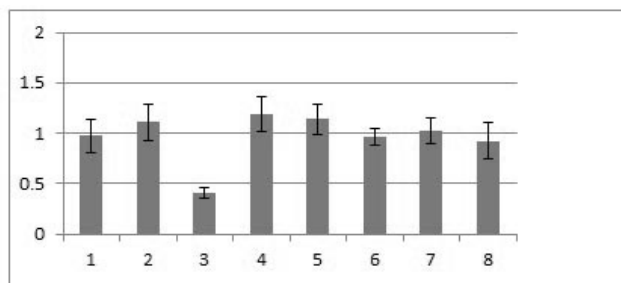
Ispitivane polimorfne varijante gena su u ovom radu predstavljene kao promene nukleotidne sekvence (*RAD51* 135G>C) ili kao promene na nivou amino kiselina (*TP53* Arg72Pro i *XRCC1* Arg399Gln), u zavisnosti od toga na koji način se najčešće navode u literaturi.

4.1. VELIKI GENSKI REARANŽMANI U *BRCA1*, *BRCA2* I *CHEK2* GENIMA

U ovom radu ispitivano je prisustvo velikih genskih rearanžmana (LGR) u genima *BRCA1* i *BRCA2* metodom MLPA, u grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika. Analiza je uspešno uradjena na 53 uzorka za prisustvo LGR-ova u *BRCA1* genu. Analiza *BRCA2* gena je bila uspešna za 51 uzorak. Svi ispitani uzorci su bili negativni na prisustvo duplikacija ili delecija celih egzona u *BRCA1/2* genima. Medjutim, primećena je značajno smanjenje intenziteta signala za probu komplementarnu devetom egzonu *CHEK2* gena u jednom uzorku, što je ukazalo na postojanje delecije 9. egzona ovog gena (Slika 21, Slika 22).



Slika 21. Obradjeni podaci intenziteta fluorescencije MLPA proba. Duplo smanjenje intenziteta probe koja se vezuje za 9. egzon *CHEK2* gena

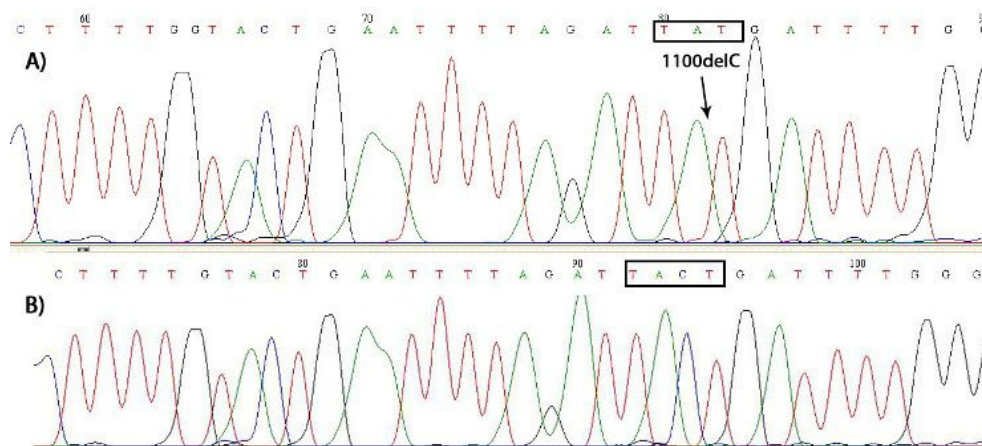


Slika 22. Obradjen signal intenziteta proba za egzon 9 *CHEK2* gena. 1-8 različiti uzorci testirani na promenu u *CHEK2*. 3- uzorak sa mutacijom

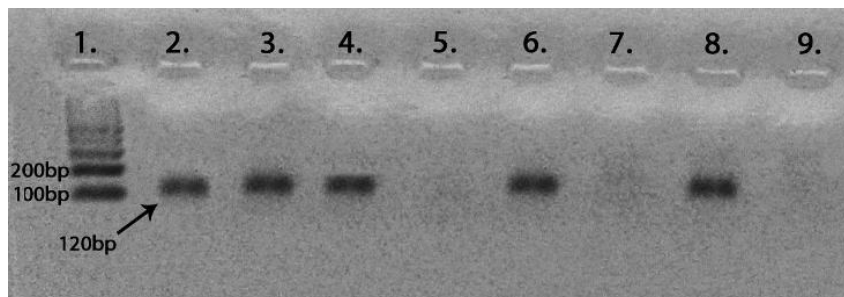
4.2. DETEKCIJA MUTACIJA U *CHEK2* GENU

4.2.1. Detekcija 1100delC mutacije

Svi uzorci iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika (n=57) uspešno su testirani na prisustvo mutacije 1100delC u *CHEK2* genu metodom alelski specifičnog PCR-a. Kao kontrola je korišćen uzorak koji je heterozigot za 1100delC (Slika 23). Kod 57 uzoraka grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika nije pronadjena 1100delC mutacija u *CHEK2* genu (Slika 24).



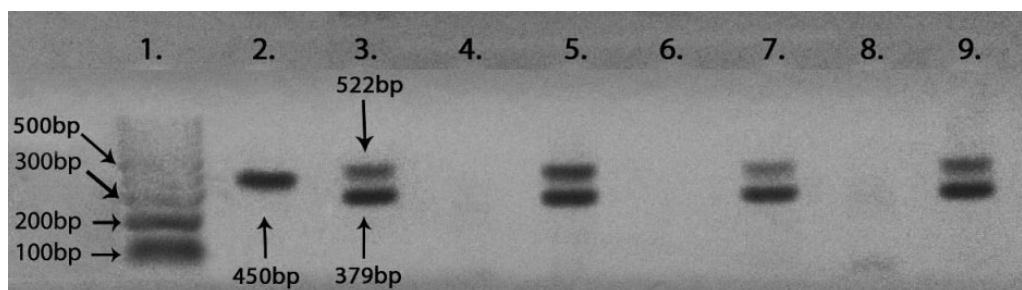
Slika 23. Pozitivna kontrola za *CHEK2* 1100delC A) Mutirani alel B) *Wt* alel



Slika 24. Detekcija 1100delC. 1- dužinski marker (*O'Gene RulerTM Fermentas*); Kontrolni heterozigotni uzorak (2 i 3)- produkti *wt* i mutiranog alela; Homozigotni *wt* uzorci: uzorak 1 (4 i 5), uzorak 2 (6 i 7)- amplifikacija samo *wt* lanca DNK

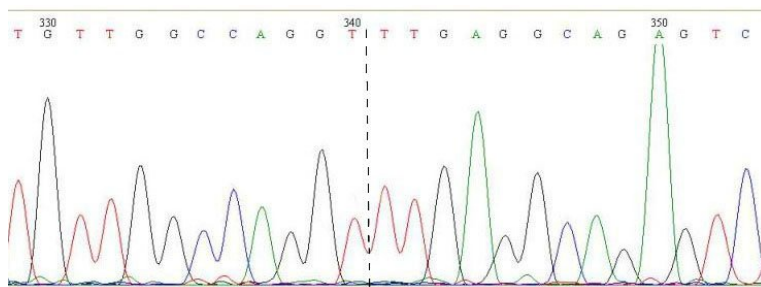
4.2.2. Detekcija Del5395 mutacije

Svi uzorci iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika (n=57) uspešno su testirani na prisustvo mutacije Del5395 u *CHEK2* genu metodom alelski specifičnog PCR-a (Slika 25). Kao kontrola je korišćen uzorak DNK sa prisutnom Del5395 mutacijom u heterozigotnom obliku.



Slika 25. Detekcija Del5395. 1- dužinski marker (*O'Gene RulerTM Fermentas*); Kontrolni uzorak (2 i 3)- dve trake (379bp i 522 bp) poreklom od *wt* alela, i traka od 450bp poreklom od mutiranog alela; Homozigotni *wt* uzorci: uzorak 1 (4 i 5), uzorak 2 (6 i 7), uzorak 3 (8 i 9)- trake poreklom od *wt* alela

U analizu na prisustvo Del5395 je uključen i uzorak koji je pokazao deleciju egzona 9 u *CHEK2* genu MLPA metodom. Kod njega je alelski specifičnim PCR-om ustanovljena mutacija Del5395 (delecija 9. i 10. egzona), a zatim je i potvrđena sekvenciranjem (Slika 26). Ostali uzorci su bili negativni na Del5395 mutaciju. Učestalost ove mutacije u grupi naslednog karcinoma dojke je bila 1/57 (1,7%).



Slika 26. Elektroferogram uzorka koji sadrži Del5395 deleciju u *CHEK2* genu. Isprekidana linija predstavlja mesto delecije. Sekvenca je predstavljena *reverse* lancem DNK

4.3. DETEKCIJA MUTACIJA U *RAD51C* GENU

48 uzoraka DNK iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika je bilo dostupno za analizu. Detekcija mutacija u celom kodirajućem regionu, kao i u delovima intronskih sekvenci *RAD51C* gena, uspešno je uradjena na 47 uzoraka DHPLC metodom. Svi profili koji su odstupali od profila negativnih kontrola su sekvencirani za potvrdu prisustva, i utvrđivanje tipa mutacije.

U grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika nisu pronadjene štetne mutacije u *RAD51C* genu. Mutacioni skrining je pokazao ukupno 5 promena u DNK (Tabela 29) uključujući 2 *missense*, jednu intronsku, jednu varijantu u 5'UTR regionu, i jednu varijantu u promotorskom regionu gena. Tri od pet detektovanih varijanti su polimorfne (učestalost najmanje zastupljenog alela, MAF>0,05): c.1-118G>A (rs16943176) sa MAF= 0,203; c.1-26C>T (rs12946397) sa MAF= 0,207, i c.904+34T>C (rs28363318) sa MAF= 0,186. Detektovane su i dve *missense* varijante nepoznatog efekta na protein, c.790G>A (p.Gly264Ser) u egzonu 5 (Slika 27) i c.859A>G (p.Thr287Ala) u egzonu 6 (Slika 28). Obe

ove varijante su prijavljene i opisane u prethodnim studijama. G264S varijantu smo detektovali samo u jednom slučaju, dok je T287A pronadjena kod tri osobe.

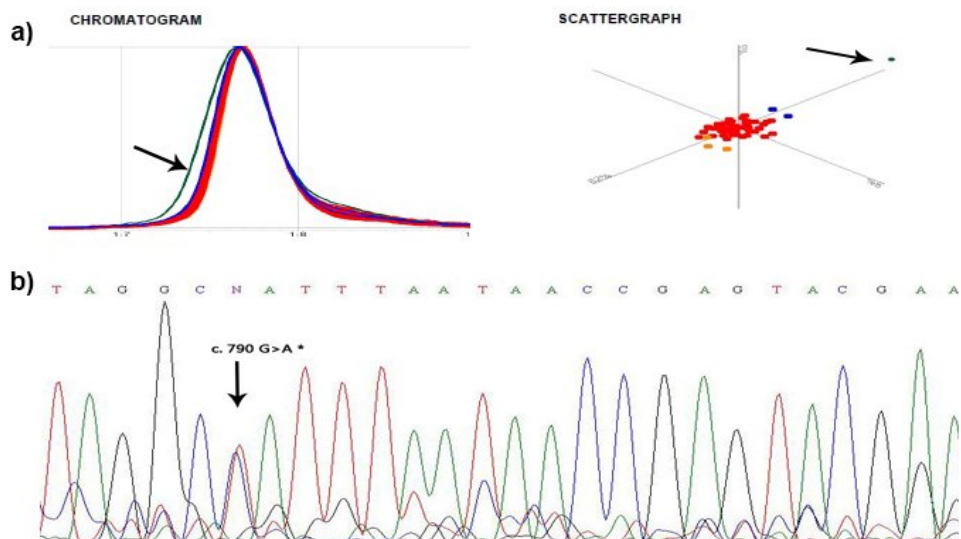
Tabela 29. Germinativne DNK varijante u *RAD51C* genu identifikovane u grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika

Varijanta	Lokacija	rs	Proteinska promena	n ³			Funkcionalna predikcija	Klinički značaj
				BC ¹	BC/OC ²			
c.1-118G>A	promotor	rs16943176	/	2	2	0	/	ne
c.1-26C>T	5'UTR	rs12946397	/	9	8	1	/	ne
c.790G>A	egzon 5	/	p.Gly264Ser	1	1	0	ne	nepoznat
c.859A>G	egzon 6	rs28363317	p.Thr287Ala	3	2	1	PD ¹	nepoznat
c.904+34T>C	intron 6	rs28363318	/	21	17	4	/	ne

¹PD- verovatno štetna (eng. *Probably Damaging*), BC- porodice sa karcinomom dojke,

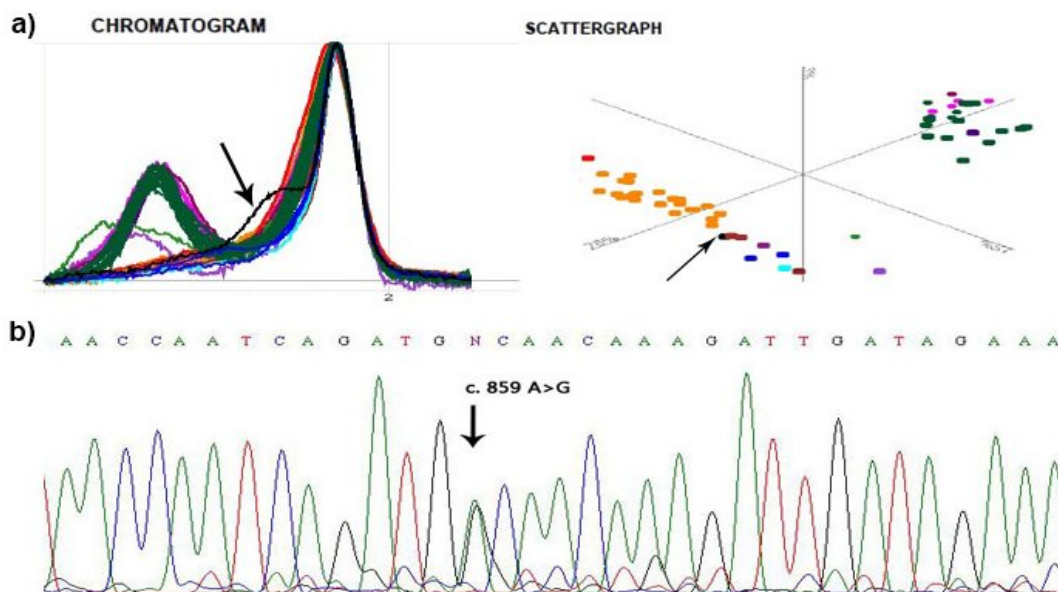
²BC/OC- porodice sa karcinomom dojke i karcinomom jajnika

³broj slučajeva u kojima je pronadjena varijanta



Slika 27. a) DHPLC hromatogram 5. egzona *RAD51C*. Strelicom je označena kriva čiji je profil odstupao od drugih uzoraka i kontrole b) Sekvenca mutacije (790 G>A).

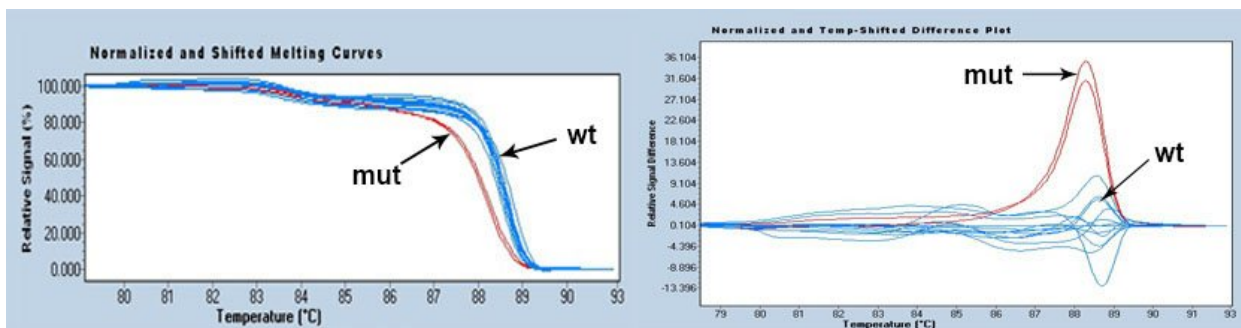
*Sekvencom je predstavljen *reverse* lanac DNK



Slika 28. a) DHPLC hromatogram 6. egzona *RAD51C*. Strelicom je označena kriva čiji je profil odstupao od drugih uzoraka i kontrole b) Sekvenca mutacije (859A>G)

4.4. DETEKCIJA MUTACIJA U *TP53* GENU

Za analizu prisustva germinativnih mutacija u 8. egzonu *TP53* gena, odabran je uzorak periferne krvi 21 osobe iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika koje su obolele od ranog karcinoma dojke (≤ 40 godina). Analiza je uspešno uradjena na svim uzorcima HRM metodom. Profili koji su odstupali od profila krivi topljenja kontrolnih uzoraka (*wt* uzorak i uzorak sa mutacijom) dalje su sekvencirani u cilju utvrđivanja prisustva i tipa mutacije (Slika 29). Nisu pronadjene štetne mutacije u 8. egzonu *TP53* gena kod 21. pacijentkinje obolele od ranog karcinoma dojke (≤ 40 godina) u uzorku naslednog karcinoma dojke/jajnika.



Slika 29. Analiza 8. egzona *TP53* gena HRM metodom. Levo- normalizovane i temperaturno pomerene krive topljenja. Desno- diferencijalni *plot*-ovi.

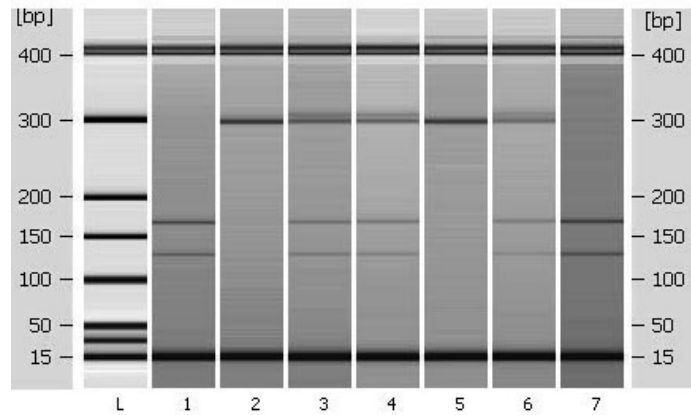
4.4.1. Raspodela genotipova polimorfne varijante kodona 72 *TP53* gena u naslednom karcinomu dojke, sistematskom karcinomu dojke i kontrolnoj grupi

Dobijeni rezultati polimorfizma RFLP u 72. kodonu *TP53* gena, Arg72Pro, prikazani su na Slici 30.

Za ovu analizu, iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika, odabrane su ženske osobe obolele od karcinoma dojke, a bilateralni karcinomi su posmatrani kao odvojeni događaji. Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u ovoj grupi (n=48) bila je: Arg/Arg 20/48 (41,7%), Arg/Pro 25/48 (52,1%) i Pro/Pro 3/48 (6,2%). Učestalost Arg alela bila je 67,7%, a Pro alela 32,3%.

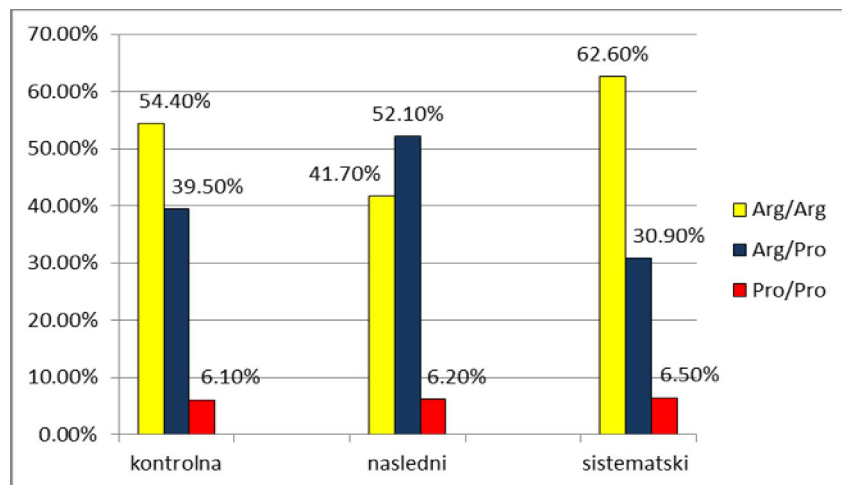
Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u sistematskom uzorku karcinoma dojke (n=107) bila je: Arg/Arg 67/107 (62,6%), Arg/Pro 33/107 (30,9%) i Pro/Pro 7/107 (6,5%). Učestalost Arg alela bila je 78%, a Pro alela 22%.

Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u kontrolnoj grupi (n=114) bila je: Arg/Arg 62/114 (54,4%), Arg/Pro 45/114 (39,5%) i Pro/Pro 7/114 (6,1%). Učestalost Arg alela bila je 74,1%, a Pro alela 25,9%. U ovoj grupi nije dobijeno odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže za ispitivani genski lokus ($\chi^2=0,09$; $p>0,05$).



Slika 30. Analiza PCR produkta egzona 4 *TP53* gena posle digestije enzimom *Bsh1236I* na *Agilent Bioanalyzer* aparatu. L-dužinski marker; 1 i 7- Arg/Arg; 2 i 5- Pro/Pro; 3,4 i 6- Arg/Pro

Raspodela genotipova *TP53* polimorfizma u svim ispitivanim grupama data je na Slici 31.



Slika 31. Raspodela genotipova Arg72Pro polimorfizma u kontrolnoj grupi (n=114), grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika (n=48), i sistematskom uzorku karcinoma dojke (n=107)

4.4.2. Ispitivanje asocijacije polimorfne varijante kodona 72 *TP53* gena sa naslednim i sistematskim karcinomom dojke

Poredili smo distribucije alelskih i genotipskih učestalosti polimorfne varijante Arg72Pro u grupi sa naslednom karcinomom dojke/jajnika sa kontrolnom grupom. Rezultati su ukazali na postojanje razlike u učestalosti Pro alela u dominantnom genetičkom modelu (Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg) između ove dve grupe, ali ovaj rezultat nije bio statistički značajan. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 30(1).

Ispitali smo i uticaj Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena na nastanak naslednog oblika karcinoma dojke kod obolelih mlađih od 40 godina. Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u ovoj grupi (n=22) bila je: Arg/Arg 9/22 (40,9%), Arg/Pro 12/22 (54,5%) i Pro/Pro 1/22 (4,6%). Učestalost Arg alela bila je 68,2%, a Pro alela 31,8%. Poređenje distribucija alela i genotipova u ovoj grupi sa kontrolnom ukazalo je na postojanje povišenog rizika za rani karcinom dojke (≤ 40 god.) i to kod nosilaca Pro alela u odnosu na Arg alel, kao i kod Pro/Pro+Arg/Pro genotipova u odnosu na Arg/Arg homozigote. Razlika u učestalosti genotipova nije bila statistički značajna. Rezultati su prikazani u Tabeli 30(2).

S obzirom da je učestalost Arg alela (Arg/Arg genotip) kod sistematskog uzorka pacijentkinja (62,6%) bila veća u odnosu na kontrole (54,4%), postavili smo hipotezu da su nosioci Arg alela u povišenom riziku za nastanak karcinoma dojke nezavisnog od porodične istorije bolesti. Rezultat je ukazao na postojanje povišenog rizika za karcinom dojke u sistematskom uzorku, i to upravo kod nosilaca Arg alela, ali taj rezultat ipak nije bio statistički značajan (Tabela 30(3)).

Ispitali smo i asocijaciju Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena sa karcinomom dojke kod obolelih mlađih od 40 godina iz sistematskog uzorka. Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u ovoj grupi (n=15) bila je: Arg/Arg 10/15 (66,7%), Arg/Pro 3/15 (20%) i Pro/Pro 2/15 (13,3%). Učestalost Arg alela bila je 76,7%, a Pro alela 23,3%. Razlike u učestalosti genotipova između ispitivane i kontrolne grupe nisu bile statistički značajne, ali su ukazale na postojanje povišenog rizika za oboljevanje kod Pro/Pro homozigota u odnosu na Arg/Pro+Arg/Arg (Tabela 30(4)).

S obzirom da smo bili zainteresovani da ispitamo postojanje razlike u učestalosti alelskih i genotipskih varijanti ovog polimorfizma između grupa naslednog i sistematskog karcinoma, analizirali smo i ove podatke. Poredjenje ove dve grupe pokazalo je statistički značajno veću zastupljenost Pro/Pro+Arg/Pro genotipova u naslednom karcinomu dojke u odnosu na sistematski (Tabela 30(5)).

Tabela 30. Asocijacija *TP53 Arg72Pro* polimorfizma sa karcinomom dojke (*obeleženi rezultat je statistički značajan)

	GRUPE	<i>TP53 Arg72Pro</i>	(OR; 95%CI)
(1)	nasledni uzorak	Pro vs. Arg	(1,36; 0,81-2,99)
	vs.	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(1,66; 0,84-3,30)
	kontrolni uzorak	Pro/Pro vs. Arg/Pro+Arg/Arg	(1,01; 0,25-4,12)
(2)	nasledni uzorak (≤ 40 god.)	Pro vs. Arg	(1,34; 0,66-2,69)
	vs.	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(1,72; 0,68-4,35)
	kontrolni uzorak	Pro/Pro vs. Arg/Pro+Arg/Arg	(0,73; 0,08-6,23)
(3)	sistematski uzorak	Arg vs. Pro	(1,24; 0,78-1,92)
	vs.	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(0,71; 0,41-1,21)
	kontrolni uzorak	Pro/Pro vs. Arg/Pro+Arg/Arg	(1,07; 0,36-3,16)
(4)	sistematski uzorak (≤ 40 god.)	Pro vs. Arg	(0,87 ; 0,36-2,14)
	vs.	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(0,71; 0,41-1,21)
	kontrolni uzorak	Pro/Pro vs. Arg/Pro+Arg/Arg	(2,35; 0,44-12,54)
(5)	nasledni uzorak	Pro vs. Arg	(1,7; 0,99-2,90)
	vs.	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(2,34; 1,17-4,70)*
	sistematski uzorak	Pro/Pro vs. Arg/Pro+Arg/Arg	(0,95; 0,23-3,85)

4.4.3. Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante kodona 72 *TP53* gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora sistematskog uzorka karcinoma dojke

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma dojke u sistematskom uzorku bila je 52 godine. Kod 56 pacijentkinja mlađih od 52 godine učestalost Arg/Arg genotipa bila je 67,9%, a Arg/Pro+Pro/Pro bila je 32,1%. Kod 51 pacijentkinje starije od 52 godine učestalost Arg/Arg genotipa bila je 56,9%, a Arg/Pro+Pro/Pro bila je 43,1%. Kada

je posmatrana starost u vreme dijagnoze, nije postojala statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između ove dve grupe ($\chi^2=1,37$; $p>0.05$).

Kod 53 pacijentkinje sa karcinomom dojke koje su bile u premenopauzi, 34 je imalo Arg/Arg genotip (64,2%), 15 (28,3%) je imalo Arg/Pro genotip, i 4 (7,5%) je imalo Pro/Pro genotip. Od 54 pacijentkinje koje su bile u postmenopauzi 33 (61,1%) je imalo Arg/Arg, 18 (33,3%) je imalo Arg/Pro, a 3 (5,6%) je imalo Pro/Pro genotipove. Nije dobijena statistički značajna razlika u učestalosti alela i genotipova između ove dve grupe.

U odnosu na parameter veličine tumora, u grupi koja je imala tumor ≤ 2 cm (T1) (n=48), Arg/Arg genotip je imalo 28 (58,3%), a Arg/Pro+Pro/Pro je imalo 20 (41,7%) pacijentkinja. Genotipovi onih koji su imali tumor >2 cm (T2+T3) (n=31) bili su: Arg/Arg kod 22 (71%), a Arg/Pro+Pro/Pro kod 9 (29%) pacijentkinja. Ovaj polimorfizam nije pokazao asocijaciju sa veličinom tumora.

S obzirom da su od dostupnih podataka, invazivni duktalni karcinom (IDC) i invazivni lobularni karcinom (ILC) bili najučestaliji, ispitali smo raspodelu genotipova u ovim grupama. Od 53 IDC tumora 33 (62,3%) je imalo Arg/Arg genotip, a 20 (37,7%) je imalo Arg/Pro+Pro/Pro genotipove. Od 35 ILC tumora 22 (62,9%) je imalo Arg/Arg, a 13 (37,1%) Arg/Pro+Pro/Pro genotipove. Razlika u distribuciji genotipova između ove dve grupe nije bila statistički značajna.

Od 77 dobro i umereno diferenciranih tumora (G1+G2), 45 (58,4%) je bilo Arg/Arg genotipa, 27 (35,1%) Arg/Pro, a 5 (6,5%) Pro/Pro genotipa. U grupi slabo diferenciranih tumora (G3) (n=18), 13 (72,2%) je imalo Arg/Arg genotip, 3 (16,7%) Arg/Pro, a 2 (11,1%) je imalo Pro/Pro genotip, što nije ukazalo na postojanje razlike u učestalosti genotipova između ove dve grupe.

Od 62 tumora koji su bili pozitivni za estrogene receptore (ER+), 35 (56,5%) je bilo Arg/Arg genotipa, a 27 (43,5%) imalo Arg/Pro+Pro/Pro genotipove. U grupi ER receptora negativnih tumora (ER-) (n=39), 27 (69,2%) je imalo Arg/Arg genotip, a 12 (30,8%) je imalo Arg/Pro+Pro/Pro genotipove. Od 55 tumora koji su bili pozitivni za receptore za progesteron (PR+), 32 (58,2%) je bilo Arg/Arg genotipa, a 23 (41,8%) imalo Arg/Pro+Pro/Pro genotipove. U grupi PR negativnih tumora (PR-) (n=46), 30 (65,2%) je imalo Arg/Arg genotip, a 16 (34,8%) je imalo Arg/Pro+Pro/Pro genotipove. Od 40 Her2+

tumora 25 (62,5%) je imalo Arg/Arg genotip, a 15 (37,5%) je imalo Arg/Pro+Pro/Pro. Od 52 Her2- tumora, 32 (61,5%) je imalo Arg/Arg genotip, a 20 (38,5%) Arg/Pro+Pro/Pro genotip. Arg72Pro polimorfizam nije pokazao statistički značajnu vezu sa ER, PR i Her2 statusom.

Ispitivali smo zastupljenost polimorfnihi varijanti *TP53* gena i u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima. Od dostupnih podataka 16 pacijenata je bilo bez prisustva metastaza (N0), i 33 pacijenta sa prisutnim metastazama u limfnim čvorovima (N+). U N0 grupi, 8 je imalo Arg/Arg genotip, a 8 Arg/Pro+Pro/Pro. U N+ grupi, 24 (72,7%) je imalo Arg/Arg, a 9 (27,3%) je imalo Arg/Pro+Pro/Pro genotipove. Značajnija razlika u rasporedu genotipova između ove dve grupe nije dobijena.

Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante *TP53* gena sa svim navedenim kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora dati su u Tabeli 31.

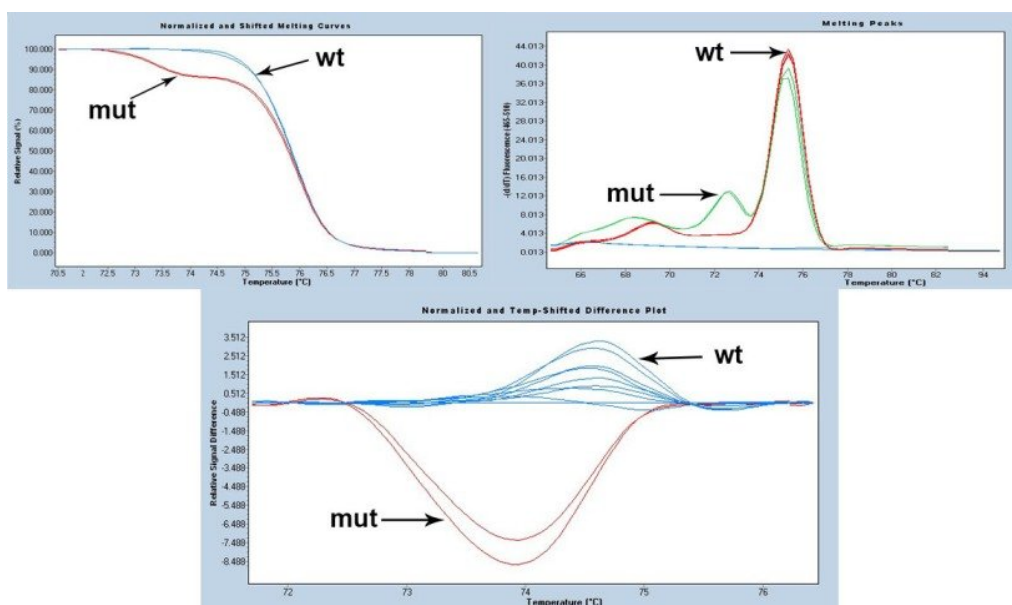
Tabela 31. Asocijacija Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora

Karakteristike tumora	<i>TP53</i> Arg72Pro	(χ^2)
<u>Veličina tumora</u> ≤2cm (T1) vs. >2cm (T2,T3)	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	$\chi^2=1,29$; p>0.05
<u>Histološki tip</u> IDC vs. ILC	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	$\chi^2=0,003$; p>0.05
<u>Histološki gradus</u> G1,G2 vs. G3	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	$\chi^2=1,16$; p>0.05
<u>Status estrogenog receptora</u> ER- vs. ER+	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	$\chi^2=1,65$; p>0.05
<u>Status progesteronskog receptora</u> PR- vs. PR+	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	$\chi^2=0,52$; p>0.05
<u>Her2 status</u> Her2- vs. Her2+	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	$\chi^2=0,52$; p>0.05
<u>Prisustvo metastaza</u> N+ vs. N0	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	$\chi^2=2,45$; p>0.05

4.5. DETEKCIJA 657del5 MUTACIJE U *NBS1* GENU

45 uzoraka iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika je bilo dostupno za analizu prisustva 657del5 mutacije u *NBS1* genu. Analiza je uspešno uradjena HRM metodom na svim uzorcima. Profili koji su odstupali od profila krivi topljenja kontrolnog uzorka (heterozigotna DNK sa 657del5 mutacijom u *NBS1* genu) su smatrani negativnim na prisustvo ove mutacije (Slika 32).

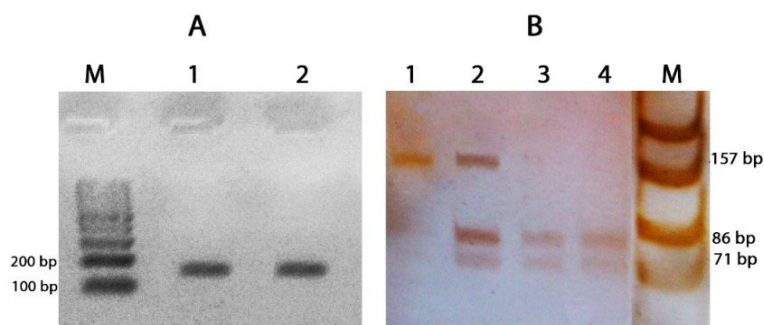
Nije pronadjena nijedna 657del5 mutacija kod 45 uzoraka iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika.



Slika 32. Analiza prisustva 657del5 mutacije u *NBS1* genu HRM metodom. Gore levo - normalizovane i temperaturno pomerene krive topljenja. Gore desno - temperature topljenja. Dole - diferencijalni *plot*

4.6. POLIMORFIZAM *RAD51* GENA 135G>C

Dobijeni rezultati polimorfizma RFLP u 5'UTR *RAD51* gena, 135G>C, prikazani su na Slici 35.



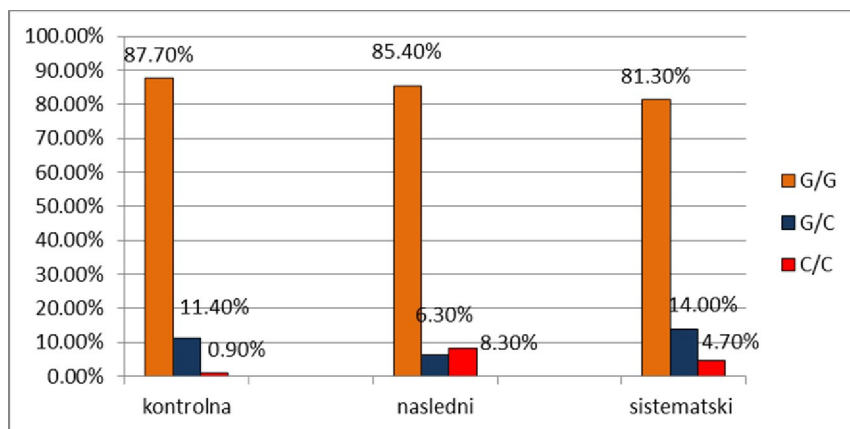
Slika 33. RFLP analiza 5'UTR polimorfizma 135G>C *RAD51* gena. A) M-dužinski marker; 1 i 2-PCR produkti B) M-dužinski marker; 1-C/C; 2- G/C; 3 i 4- G/G

4.6.1. Raspodela genotipova polimorfne varijante 5'UTR *RAD51* gena u naslednom karcinomu dojke, sistematskom karcinomu dojke i kontrolnoj grupi

Za ovu analizu iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika odabrane su ženske osobe obolele od karcinoma dojke, a bilateralni karcinomi su posmatrani kao odvojeni događaji. Raspodela genotipova polimorfne varijante 5'UTR *RAD51* gena u ovoj grupi (n=48) bila je: G/G- 41/48 (85,4%), G/C- 3/48 (6,3%) i C/C- 4/48 (8,3%). Učestalost G alela bila je 88,5%, a C alela 11,5%.

Raspodela genotipova 5'UTR *RAD51* gena u sistematskom uzorku karcinoma dojke (n=107) bila je: G/G- 87/107 (81,3%), G/C- 15/107 (14%) i C/C- 5/107 (4,7%). Učestalost G alela bila je 88,3%, a C alela 11,7%.

Raspodela genotipova 5'UTR *RAD51* gena u kontrolnoj grupi (n=114) bila je: G/G- 100/114 (87,7%), G/C- 13/114 (11,4%) i C/C- 1/114 (0,9%). Učestalost G alela bila je 93,4%, a C alela 6,6%. U ovoj grupi nije dobijeno odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže za ispitivani genski lokus ($\chi^2 = 0,58$; $p > 0,05$). Raspodela polimorfizma 135G>C u svim grupama data je na Slici 34.



Slika 34. Raspodela genotipova 135G>C polimorfizma u kontrolnoj grupi (n=114), grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika (n=48) i sistematskom uzorku karcinoma dojke (n=107)

4.6.2. Ispitivanje asocijacije polimorfne varijante 5'UTR *RAD51* gena sa naslednim i sistematskim karcinomom dojke

S obzirom da je postojala razlika u učestalosti C/C genotipa u naslednom karcinomu dojke (8,30%) i u kontrolnoj grupi (0,90%), postavili smo hipotezu da nosioci ovog genotipa imaju povišen rizik za nastanak nasledne forme karcinoma dojke. Pokazali smo da je varijanta *RAD51* gena 135C statistički značajno asocirana sa pojavom naslednog karcinoma dojke/jajnika i to u recesivnom modelu kod nosilaca C/C genotipa (C/C vs. C/G+G/G). Rezultati su prikazani u Tabeli 32(1).

Ispitali smo i uticaj 135G>C polimorfizma na nastanak naslednog oblika karcinoma dojke kod obolelih mlađjih od 40 godina. Raspodela genotipova 5'UTR *RAD51* gena u ovoj grupi (n=22) bila je: G/G- 19/22 (86,4%), G/C- 2/22 (9,1%) i C/C- 1/22 (4,5). Učestalost G alela bila je 90,9%, a C alela 9,1%. Poredjenje distribucije genotipova u odnosu na kontrolnu grupu nije pokazalo statistički značajnu razliku. Rezultati su prikazani u Tabeli 32(2).

S obzirom da je postojala razlika učestalosti C/C genotipa u sistematskom uzorku u odnosu na kontrolni (4,70% vs. 0,90%) isto kao i G/C genotipa (14% vs. 11,4%), postavili smo hipotezu da su nosioci C alela u povišenom riziku za nastanak karcinoma dojke

nezavisnog od porodične istorije bolesti. Iako je prvobitna razlika ukazivala na postojanje statističke značajnosti, ona nije potvrđena (Tabela 32(3)).

Ispitali smo i asocijaciju 135G>C polimorfizma *RAD51* gena sa karcinomom dojke kod obolelih mlađih od 40 godina iz sistematskog uzorka. Raspodela genotipova u ovoj grupi (n=15) bila je: G/G- 11/15 (73,3%), G/C- 3/15 (20%) i C/C- 1/15 (6,7%). Učestalost G alela bila je 83,3% a C alela 16,7%. Iako je postojala razlika u učestalosti C/C genotipa u ispitivanoj grupi (6,7%) u odnosu na kontrolnu (0,9%) kao i G/C genotipa između ove dve grupe (20% vs. 11,4%), ova razlika ipak nije bila statistički značajna. Rezultati su prikazani u Tabeli 32(4).

Ispitivano je i postojanje razlike u učestalosti alelskih i genotipskih varijanti ovog polimorfizma kod pacijentkinja sa naslednim karcinomom dojke u odnosu na pacijentkinje iz sistematskog uzorka, ali nije utvrđena statistički značajna razlika (Tabela 32(4)).

Tabela 32. Povezanost *RAD51* 135 G>C polimorfizma sa karcinomom dojke (* rezultat je statistički značajan)

	GRUPE	RAD51 135 G>C	(OR; 95% CI)
(1)	nasledni uzorak vs. kontrolni uzorak	C vs. G C/C+G/C vs. G/G C/C vs. C/G+G/G	(1,81; 0,813-4,16) (1,21; 0,46-3,24) (10,28; 1,12-94,5)*
(2)	nasledni uzorak (≤40 god.) vs. kontrolni uzorak	C vs. G C/C+G/C vs. G/G C/C vs. C/G+G/G	(1,42; 0,45-4,50) (1,13; 0,29-4,31) (5,38; 0,32-89,44)
(3)	sistematski uzorak vs. kontrolni uzorak	C vs. G C/C+G/C vs. G/G C/C vs. C/G+G/G	(1,87; 0,96-3,67) (1,64; 0,78-3,44) (5,58; 0,64-48,63)
(4)	sistematski uzorak (≤40 god.) vs. kontrolni uzorak	C vs. G C/C+G/C vs. G/G C/C vs. C/G+G/G	(2,84; 0,95-8,48) (2,59; 0,72- 9,28) (8,14; 0,48-137,6)
(5)	nasledni uzorak vs. sistematski uzorak	C vs. G C/C+G/C vs. G/G C/C vs. C/G+G/G	(0,98; 0,46-2,08) (0,74; 0,29-1,90) (0,22; 0,05-0,94)

4.6.3. Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante 5'UTR *RAD51* gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora sistematskog uzorka karcinoma dojke

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma dojke u sistematskom uzorku bila je 52 godine. Kod 56 pacijentkinja mlađih od 52 godine učestalost G/G genotipa bila je 82,1%, a G/C+C/C je bila 17,9%. Kod 51 pacijentkinje starije od 52 godine učestalost G/G genotipa je bila 80,4%, a G/C+C/C bila je 19,6%. Nije postojala statistički značajna razlika učestalosti genotipova u zavisnosti od starosti u vreme dijagnoze ($\chi^2=0,05$; $p>0,05$).

Kod 53 pacijentkinje sa karcinomom dojke koje su bile u premenopauzi, 43 je imalo G/G genotip (81,1%), 9 (17%) je imalo G/C genotip, i 1 (1,9%) je imao C/C genotip. Od 54 pacijentkinje koje su bile u postmenopauzi 44 (81,5%) je imalo G/G, 6 (11,1%) je imalo G/C, a 4 (7,4%) je imalo C/C genotipove. Nije postojala statistički značajna razlika u učestalosti alela i genotipova između ove dve grupe.

U odnosu na parameter veličine tumora, u grupi koja je imala tumor ≤ 2 cm (T1) (n=48), G/G genotip je imalo 41 (85,4%), a G/C+C/C je imalo 7 (14,6%). Genotipovi onih koji su imali tumor > 2 cm (T2+T3) (n=31) bili su: G/G kod 27 (87,1%), a G/C+C/C kod 4 (12,9%). Nije postojala statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između ove dve grupe.

Ispitivana je raspodela genotipova u dva najučestalija histološka tipa tumora, invazivnom duktalnom karcinomu (IDC) (n=53) i invazivnom lobularnom karcinomu (ILC) (n=35). U grupi IDC karcinoma raspodela je bila sledeća: G/G- 42 (79,2%), G/C+C/C- 11(20,8%), a u grupi ILC karcinoma: G/G- 30(85,7%), G/C+C/C- 5 (14,3%). Ovaj polimorfizam nije pokazao vezu sa histološkim tipom tumora.

Od 77 dobro i umereno diferenciranih tumora (G1+G2), 63 (81,8%) je bilo G/G genotipa, 11 (14,3%)- G/C, a 3 (3,9%) je imalo C/C genotip. U grupi slabo diferenciranih tumora (G3) (n=18), 13 (72,2%) je imalo G/G genotip, 3 (16,7%)- G/C, a 2 (11,1%) je imalo C/C genotip, što nije ukazalo na postojanje razlike u učestalosti genotipova između ove dve grupe.

Od 62 uzorka tumora koji su bili pozitivni za estrogini receptor (ER+), 54 (87,1%) je bilo G/G genotipa, a 8 (12,9%) je imalo G/C+C/C genotipove. U grupi ER receptor negativnih tumora (ER-) (n=39), 28 (71,8%) je imalo G/G genotip, a 11 (28,2%) je imalo G/C+C/C genotipove. Postojala je značajna razlika u učestalosti C alela u dominantnom i recesivnom modelu kod ER- u odnosu na ER+ karcinome (Tabela 33). Od 55 tumora koji su bili pozitivni za receptor za progesteron (PR+), 48 (87,3%) je bilo G/G genotipa, a 7 (12,7%) imalo G/C+C/C genotipove. U grupi PR negativnih tumora (PR-) (n=46), 34 (73,9%) je imalo G/G genotip, a 12 (26,1%) je imalo G/C+C/C genotipove. Što se tiče Her2 statusa tumora, od 40 Her2+ tumora 34 (85%) je imalo G/G genotip, a 6 (15%) je imalo G/C+C/C. Od 52 Her2- tumora, 40 (76,9%) je imalo G/G genotip, a 12 (23,1%) G/C+C/C genotip. 135G>C polimorfizam nije pokazao statistički značajnu vezu sa PR i Her2 statusom.

Ispitivana je i zastupljenost polimorfnihi varijanti *RAD51* gena u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima. Od dostupnih podataka 16 pacijenata je bilo bez prisustva metastaza (N0) i 33 pacijenta sa prisutnim metastazama u limfnim čvorovima (N+). U N0 grupi, 13 (81,3%) je imalo G/G genotip, a 3 (18,7%) G/C+C/C. U N+ grupi, 25 (75,8%) je imalo G/G, a 8 (24,2%) je imalo G/C+C/C genotipove.

Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante *RAD51* gena sa svim navedenim kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora dat je u Tabeli 33.

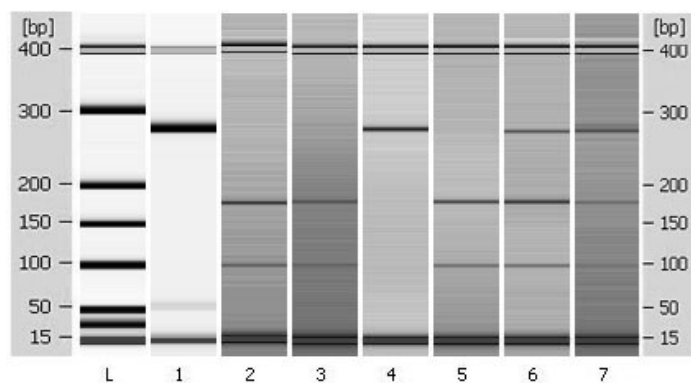
Tabela 33. Asocijacija *RAD51* 135 G>C polimorfizma sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora (*rezultat je ukazao na statističku značajnost, ^avrednost Fišerovog testa)

Karakteristike tumora	<i>RAD51</i> 135 G>C	(χ^2)
<u>Veličina tumora</u> ≤2cm (T1) vs. >2cm (T2,T3)	C/C+G/C vs. G/G	$\chi^2=0,04$; p>0.05
<u>Histološki tip</u> IDC vs. ILC	C/C+G/C vs. G/G	$\chi^2=0,59$; p>0.05
<u>Histološki gradus</u> G1,G2 vs. G3	C/C+G/C vs. G/G	$\chi^2=1,43$; p>0.05

<u>Status estrogenog receptora</u> ER- vs. ER+	C/C+G/C vs. G/G	$\chi^2=3,67^*$ OR= 2,65; 95% CI=0,96-7,34
	C/C vs. C/G+G/G	$\chi^2=3,80^*$ OR= 6,97; 95% CI=0,75-64,86
<u>Status progesteronskog receptora</u> PR- vs. PR+	C/C+G/C vs. G/G	$\chi^2=2,93$; p>0.05
<u>Her2 status</u> Her2- vs. Her2+	C/C+G/C vs. G/G	$\chi^2=0,94$; p>0.05
<u>Prisustvo metastaza</u> N+ vs. N0	C/C+G/C vs. G/G	P=0,267 ^a

4.7. POLIMORFIZAM Arg399Gln *XRCC1* GENA

Dobijeni rezultati polimorfizma RFLP u 399 kodonu *XRCC1* gena, Arg399Gln, prikazani su na Slici 35.



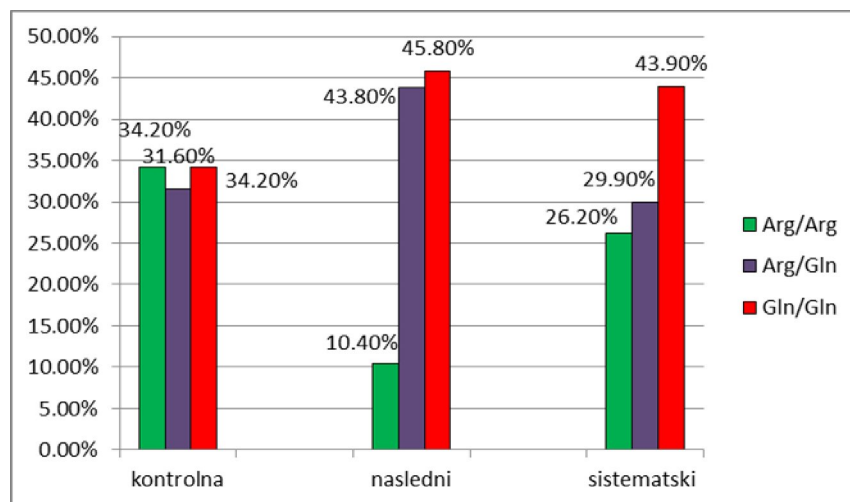
Slika 35. Analiza PCR produkta egzona 10 *XRCC1* gena posle digestije sa enzimom *BclI* na *Agilent Bioanalyzer* aparatu. L-dužinski marker; 1- PCR produkt; 2,3 i 5-Arg/Arg; 4- Gln/Gln; 6 i 7- Arg/Gln

4.7.1. Raspodela genotipova polimorfne varijanti kodona 399 *XRCCI* gena u naslednom karcinomu dojke, sistematskom karcinomu dojke i kontrolnoj grupi

Za ovu analizu iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika odabrane su ženske osobe obolele od karcinoma dojke, a bilateralni karcinomi su posmatrani kao odvojeni događaji. Raspodela genotipova polimorfnihi varijanti 399 kodona *XRCCI* gena u ovoj grupi (n=48) bila je: Arg/Arg- 5 (10,4%), Arg/Gln- 21 (43,8%) i Gln/Gln- 22 (45,8%). Učestalost Arg alela bila je 32,3% a Gln alela 67,7%.

Raspodela genotipova 399. kodona *XRCCI* gena u sistematskom uzorku karcinoma dojke (n=107) bila je: Arg/Arg- 28/107 (26,2%), Arg/Gln- 32/107 (29,9%) i Gln/Gln- 47/107 (43,9%). Učestalost Arg alela bila je 41,1%, a Gln alela 58,9%.

Raspodela genotipova 399. kodona *XRCCI* gena u kontrolnoj grupi (n=114) bila je: Arg/Arg- 39/114 (34,2%), Arg/Gln- 36/114 (31,6%) i Gln/Gln- 39/114 (34,2%). Učestalosti Arg i Gln alela bile su jednake (50%). Ova grupa nije bila u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus ($\chi^2 = 15,4$; $p < 0,05$). Raspodela genotipova Arg399Gln polimorfizma u svim grupama data je na Slici 36.



Slika 36. Raspodela genotipova Arg399Gln polimorfizma u kontrolnoj grupi (n=114), grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika (n=48) i sistematskom uzorku karcinoma dojke (n=107)

4.7.2. Ispitivanje asocijacije polimorfne varijante kodona 399 *XRCCI* gena sa naslednim i sistematskim karcinomom dojke

S obzirom da je postojala razlika učestalosti Gln/Gln genotipova u grupi pacijentkinja (45,8%) u odnosu na kontrolnu grupu (34,2%) ($\chi^2=8,56$; $p<0,05$), postavili smo hipotezu da su nosioci Gln alela (Gln/Gln+Arg/Gln) u povišenom riziku za nastanak nasledne forme bolesti. Poredjenjem ove dve grupe pokazali smo da nosioci Gln alela imaju statistički značajno povišen rizik za nasledni karcinom dojke u odnosu na nosioce Arg alela. Povećan rizik pokazan je i u dominantnom modelu (Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg). Rezultati su predstavljeni u Tabeli 34(1).

Ispitali smo i uticaj Arg399Gln polimorfizma na nastanak naslednog oblika karcinoma dojke kod obolelih mlađjih od 40 godina. Raspodela genotipova 399. kodona *XRCCI* gena u ovoj grupi (n=22) bila je: Arg/Arg- 1/22 (4,6%), Arg/Gln- 7/22 (31,8%) i Gln/Gln- 14/22 (63,6%). Učestalost Arg alela bila je 20,5% a Gln alela 79,5%. Poredjenjem sa celom kontrolnom grupom, kod pacijentkinja je pokazana statistički značajno veća zastupljenost Gln alela u recesivnom modelu. Značaj 399Gln varijante je potvrđjen i u dominantnom modelu (Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg) (Tabela 34(2)).

S obzirom da je primećena razlika u učestalosti Gln/Gln genotipa u grupi pacijentkinja (43,9%) u odnosu na kontrole (34,2%), postavili smo hipotezu da su nosioci Gln alela u povišenom riziku za nastanak karcinoma dojke nezavisnog od porodične istorije bolesti. Prvobitno uočene razlike u učestalosti genotipova između ove dve grupe nisu bile statistički značajne (Tabela 34(3)).

Ispitali smo i asocijaciju Arg399Gln polimorfizma *XRCCI* gena sa karcinomom dojke kod obolelih mlađjih od 40 godina iz sistematskog uzorka. Raspodela genotipova u ovoj grupi (n=15) bila je: Arg/Arg- 6/15 (40%), Arg/Gln- 5/15 (33,3%) i Gln/Gln- 4/15 (26,7%). Učestalost Arg alela bila je 56,7% a C alela 43,3%. Poredjenjem sa celom kontrolnom grupom nije uočena značajnija veza Arg399Gln polimorfizma *XRCCI* gena sa karcinomom dojke u ovoj ispitivanoj grupi (Tabela 34(4)).

Ispitivano je i postojanje razlike u učestalosti alelskih i genotipskih varijanti ovog polimorfizma kod pacijentkinja sa naslednim karcinomom dojke u odnosu na pacijentkinje

iz sistematskog uzorka. Poredjenje ove dve grupe pokazalo je statistički značajno veću zastupljenost Gln/Gln+Arg/Gln genotipova u naslednom karcinomu dojke u odnosu na sistematski (89,6% vs. 73,8%; $\chi^2=4,9$; $p<0,05$) (Tabela 34(5)).

Ispitali smo i asocijaciju ovog polimorfizma sa karcinomom dojke kod obolelih mlađih od 40 godina u obe grupe, ali smo ovog puta kao kontrolu koristili zdrave osobe starije od 60 godina. Ovako formirana kontrolna grupa (n=27) imala je sledeću raspodelu genotipova: Arg/Arg- 11/27 (40,7%), Arg/Gln- 9/27 (33,3%) i Gln/Gln- 7/27 (26,%). Ova grupa jeste bila u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus ($\chi^2=2,76$; $p>0,05$). Dobijeni rezultati nisu se značajnije razlikovali od onih dobijenih korišćenjem cele kontrolne grupe (Tabela 34(6),(7)).

Tabela 34. Asocijacija *XRCCI Arg399Gln* polimorfizma sa karcinomom dojke (* rezultati su statistički značajni)

	GRUPE	<i>XRCCI Arg399Gln</i>	(OR; 95% CI)
(1)	nasledni uzorak vs. ceo kontrolni uzorak	Gln vs.Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg Gln/Gln vs.Arg/Gln+Arg/Arg	(2,1; 1,27-3,46)* (4,47; 1,64-12,2)* (1,62; 0,82-3,23)
(2)	nasledni uzorak (≤ 40 god.) vs. ceo kontrolni uzorak	Gln vs.Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg	(3,89; 1,79-8,46)* (10,9; 1,41-84,24)* (3,36; 1,30-8,70)*
(3)	sistematski uzorak vs. ceo kontrolni uzorak	Gln vs.Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg	(1,43; 0,98-2,09) (1,47; 0,82-2,62) (1,50; 0,87-2,60)
(4)	sistematski uzorak (≤ 40 god.) vs. ceo kontrolni uzorak	Gln vs.Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg	(0,76; 0,35-1,65) (0,78; 0,23-2,35) (0,7; 0,21-2,34)
(5)	nasledni uzorak vs. sistematski uzorak	Gln vs.Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg	(1,46; 0,88-2,43) (3,05; 1,09- 8,47)* (1,08; 0,54-2,14)
(6)	nasledni uzorak (≤ 40 god.) vs. kontrolni uzorak >60 god.	Gln vs.Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg	(5,24; 2,1-13,02)* (14,4; 1,7-123,7)* (5; 1,47-16,98)*
(7)	sistematski uzorak (≤ 40 god.) vs. kontrolni uzorak >60 god.	Gln vs.Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg	(1,03; 0,42- 2,54) (1,03; 0,28-3,73) (1,04; 0,25-4,35)

4.7.3. Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante 5'UTR *RAD51* gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora sistematskog uzorka karcinoma dojke

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma dojke u sistematskom uzorku bila je 52 godine. Kod 56 pacijentkinja mlađih od 52 godine učestalost Arg/Arg genotipa bila je 25%, a Arg/Gln+Gln/Gln bila je 75%. Kod 51 pacijentkinje starije od 52 godine učestalost Arg/Arg je bila 27,5%, a Arg/Gln+Gln/Gln bila je 72,5%. Nije postojala statistički značajna razlika učestalosti genotipova između ove dve grupe ($\chi^2=0,08$; $p>0,05$).

Kod 53 pacijentkinje sa karcinomom dojke koje su bile u premenopauzi, 15 je imalo Arg/Arg genotip (28,3%), 17 (32,1%) je imalo Arg/Gln genotip, i 21 (39,6%) je imao Gln/Gln genotip. Od 54 pacijentkinje koje su bile u postmenopauzi 13 (24,1%) je imalo Arg/Arg, 15 (27,8%) je imalo Arg/Gln, a 26 (48,1%) je imalo Gln/Gln genotipove. Nije postojala statistički značajna razlika u učestalosti alela i genotipova između ove dve grupe.

U odnosu na parameter veličine tumora, u grupi koja je imala tumor ≤ 2 cm (T1) (n=48), Arg/Arg genotip je imalo 10 (20,8%), a Arg/Gln+Gln/Gln je imalo 38 (79,2%). Genotipovi onih koji su imali tumor >2 cm (T2+T3) (n=31) bili su: Arg/Arg kod 9 (29%), a Arg/Gln+Gln/Gln kod 22 (71%). Razlika u distribuciji genotipova između ove dve grupe nije bila statistički značajna.

Ispitivana je raspodela genotipova u dva najučestalija histološka tipa tumora, invazivnom duktalnom karcinomu (IDC) (n=53) i invazivnom lobularnom karcinomu (ILC) (n=35). U grupi IDC karcinoma raspodela je bila sledeća: Arg/Arg- 20(37,7%), Arg/Gln+Gln/Gln- 33(62,3%), a u grupi ILC karcinoma: Arg/Arg- 6(17,1%), Arg/Gln+Gln/Gln- 29(82,9%). Postojala je značajna razlika zastupljenosti Arg/Gln+Gln/Gln genotipova između ove dve grupe (OR=2,92; 95% CI=1,03- 8,28) (Tabela 35).

Od 77 dobro i umereno diferenciranih tumora (G1+G2), 22 (28,6%) je bilo Arg/Arg genotipa, 21 (27,3%) Arg/Gln, a 34 (44,1%) je imalo Gln/Gln genotip. U grupi slabo diferenciranih tumora (G3) (n=18), 3 (16,7%) je imalo Arg/Arg genotip, 7 (38,9%)

Arg/Gln, a 8 (44,4%) je imalo Gln/Gln genotip, što nije ukazalo na postojanje razlike u učestalosti genotipova između ove dve grupe.

Od 62 tumora koji su bili ER+, 15 (24,2%) je bilo Arg/Arg genotipa, a 47 (75,8%) imalo Arg/Gln+Gln/Gln genotipove. U grupi ER- tumora (n=39), 11(28,2%) je imalo Arg/Arg genotip, a 28 (71,8%) je imalo Arg/Gln+Gln/Gln genotipove. Od 55 tumora koji su bili PR+, 13 (23,6%) je bilo Arg/Arg genotipa, a 42 (76,4%) imalo Arg/Gln+Gln/Gln genotipove. U grupi PR- tumora (n=46), 13 (28,3%) je imalo Arg/Arg genotip, a 33 (71,7%) je imalo Arg/Gln+Gln/Gln genotipove. Što se tiče Her2 statusa tumora, od 40 Her2+ tumora 12 (30%) je imalo Arg/Arg genotip, a 28 (70%) je imalo Arg/Gln+Gln/Gln. Od 52 Her2- tumora, 12 (23,1%) je imalo Arg/Arg genotip, a 40 (76,9%) Arg/Gln+Gln/Gln genotip. Arg399Gln polimorfizam nije pokazao statistički značajnu vezu sa ER, PR i Her2 statusom.

Ispitivana je i zastupljenost polimorfničkih varijanti *XRCCI* gena u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima. Od dostupnih podataka 16 pacijenata je bilo bez prisustva metastaza (N0) i 33 pacijenta sa prisutnim metastazama u limfnim čvorovima (N+). U N0 grupi, 2 (12,5%) je imalo Arg/Arg genotip, a 14 (87,5%) Arg/Gln+Gln/Gln. U N+ grupi, 7 (21,2%) je imalo Arg/Arg, a 26 (78,8%) je imalo Arg/Gln+Gln/Gln genotipove.

Rezultati ispitivanja asocijacije polimorfne varijante *XRCCI* gena sa svim navedenim kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora dat je u tabeli 35.

Tabela 35. Asocijacija *XRCC1* Arg399Gln polimorfizma sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora (*rezultat je statistički značajan, ^avrednost Fišerovog testa)

Karakteristike tumora	<i>XRCC1</i> Arg399Gln	(χ^2)
<u>Veličina tumora</u> ≤2cm (T1) vs. >2cm (T2,T3)	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	$\chi^2=0,69$; p>0.05
<u>Histološki tip</u> IDC vs. ILC	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	$\chi^2=4,29^*$ OR= 2,92; 95% CI=1,03-8,28
<u>Histološki gradus</u> G1,G2 vs. G3	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	P=0,15 ^a
<u>Status estrogenog receptora</u> ER- vs. ER+	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	$\chi^2=0,20$; p>0.05
<u>Status progesteronskog receptora</u> PR- vs. PR+	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	$\chi^2=0,28$; p>0.05
<u>Her2 status</u> Her2- vs. Her2+	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	$\chi^2=0,56$; p>0.05
<u>Prisustvo metastaza</u> N+ vs. N0	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	P=0,24 ^a

4.8. ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA *TP53*, *RAD51* i *XRCC1* GENA KAO PROGNOСТИČKIH FAKTORA U KARCINOMU DOJKE

U ovom radu smo ispitivali i asocijaciju polimorfničkih varijanti *TP53*, *RAD51* i *XRCC1* gena sa prisustvom bioloških markera (ER, PR i Her2) u sistematskom uzorku karcinoma dojke. Iz sistematskog uzorka smo odabrali prognostički najlošiju grupu pacijentkinja čiji su tumori bili negativni za ER, PR i Her2 (eng. *triple-negative breast cancer*- TNBC) (TNBC grupa) (n=12). Raspodela i učestalost polimorfničkih varijanti u ovoj grupi upoređivana je u odnosu na grupu koja je pokazivala najbolje prognostičke karakteristike i čiji su karcinomi bili pozitivni za ER i PR, ali negativni za Her2 (n=34) (ER+PR+Her2- grupa), kao i u odnosu na grupu pacijenata koji nisu imali TNBC fenotip ali koji nisu dalje definisani u odnosu na ER, PR i Her2 status (preostali pacijenti). Rezultati ovih ispitivanja dati su u Tabeli 36. *RAD51* 135G>C polimorfizam se pokazao kao značajan u TNBC sa C alelom povezanim sa lošijom prognozom bolesti.

Tabela 36. Asocijacija polimorfizama u *TP53*, *RAD51* i *XRCCI* genima sa biološkim markerima karcinoma dojke (*rezultati koji su statistički značajni)

polimorfizmi (OR;95%CI)	TNBC grupa vs. ER+PR+Her2- grupa	TNBC grupa vs. preostale pacijentkinje
	<i>TP53</i> Arg72Pro	Pro vs. Arg (0,93; 0,297-2,91) Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg (0,81; 0,2-3,23) Pro/Pro vs. Arg/Pro+Arg/Arg (1,5; 0,13-18,19)
<i>RAD51</i> 135G>C	C vs. G (8,0; 2,14-29,93)* C/C+G/C vs. G/G (7,5; 1,61-34,95)* C/C vs. G/C+G/G (16,43; 0,73-369,82)	C vs. G (6,36; 2,33-18,90)* C/C+G/C vs. G/G (6,27;1,71-22,78)* C/C vs. G/C+G/G (5,13; 0,76-34,55)
<i>XRCCI</i> Arg399Gln	Gln vs. Arg (2,37; 0,84-6,70) Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg (5,26; 0,6-46,06) Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg (1,77; 0,47-6,72)	Gln vs. Arg (2,22; 0,84-5,88) Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg (4,44; 0,54-36,38) Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg (2,2; 0,65-7,48)

5. DISKUSIJA

Iako nasledni karcinom dojke čini oko 5-10% od svih slučajeva (Hollestelle i sar., 2010; Lallo i Evans 2012; Apostolou i Fostira, 2013), značaj prepoznavanja osoba pod rizikom je nemerljiv kod porodica sa većim brojem članova obolelih od ove bolesti. Ukoliko se primeti nakupljanje karcinoma dojke i/ili jajnika u porodičnom stablu i ukoliko se javi multipli primarni ili bilateralni karcinomi kao i karcinom u mlađem životnom dobu, treba posumnjati na sindrom naslednog karcinoma dojke/jajnika (HBOC). U takvim, visokorizičnim porodicama, prvo se vrši testiranje na prisustvo mutacija u visoko penetrabilnim genima *BRCA1* i *BRCA2*, i na osnovu prisustva štetnih mutacija se vrši procena rizika za oboljevanje od ove bolesti. Medjutim, ukoliko mutacije u ova dva gena nisu pronadjene, postavlja se pitanje postojanja drugih varijanti koji doprinose riziku za oboljevanje. Otkriven je veći broj srednje i nisko penetrabilnih gena u karcinomu dojke, ali se još uvek vode debate o tome da li ih treba uključiti u rutinsko testiranje. Jedan od razloga je njihov mali pojedinačni značaj za nastanak karcinoma dojke, a drugi se odnosi na još

uvek neotkriven klinički značaj brojnih poznatih varijanti, pa bi njihovim uvođenjem u rutinsko testiranje doprineli dodatnoj zabuni pri interpretaciji rezultata.

5.1. ISPITIVANJE VELIKIH GENSKIH REARANŽMANA U *BRCA1* I *BRCA2* GENIMA

BRCA1 gen je otkriven 1990. godine a četiri godine nakon toga je i kloniran (Claus i sar., 1991). Jedna od 500 do 1000 osoba je nosilac štetne mutacije u *BRCA1* genu (izvan osnivačke populacije), što čini oko 7-10% mutacija u naslednom karcinomu dojke (Lalloo i Evans, 2012). Činjenica da mutacije u ovom genu nemaju kompletnu penetrabilnost ukazuje na to da njihovi nosioci neće obavezno oboleti od karcinoma dojke. U tom slučaju se govori o ispitivanju procene rizika kod nosilaca štetnih mutacija, koje u slučaju *BRCA1* doprinose povećanju životnog rizika za karcinom dojke 60–80% (Ripperger i sar., 2009; Mavaddat i sar., 2010; Meindl i sar., 2011), kao i povećanju relativnog rizika u mladjem životnom dobu. Pored karcinoma dojke, oni doprinose i nastanku karcinoma jajnika (40-60%). Mutacije u *BRCA2* genu su pronađene u 10% porodica sa naslednim karcinomom dojke/jajnika, i doprinose životnom riziku za oboljevanje od 40-85%. Rizik za oboljevanje od karcinoma jajnika ide do 20%. Mutacije u *BRCA2* genu doprinose riziku za oboljevanje od muškog karcinoma dojke (6%), karcinoma prostate (20%) i karcinoma pankreasa (3%) (Meindl i sar., 2011; Lalloo i Evans, 2012).

Veliki genski rearanžmani u *BRCA1* genu su prvi put prijavljeni tek 1997. godine, nekoliko godina nakon otkrića ovog gena (Puget i sar., 1997). Prva detektovana promena bila je delecija 1kb fragmenta koji sadrži egzon 17, koja je vodila preranom zaustavljanju sinteze proteina i drastičnom smanjenju nivoa *BRCA1* iRNK. Promena je pronađena u velikoj porodici sa 14 slučajeva karcinoma dojke i 11 slučajeva karcinoma jajnika. Prateći ovaj model, iste godine je pronađena delecija koja uklanja 1a, 1b i 2 egzone *BRCA1* gena (Swensen i sar., 1997). Nakon ovih inicijalnih istraživanja, pretpostavilo se da nedostatak kvantitativnih metoda za detekciju velikih genskih promena predstavlja glavni razlog činjenice da ovakve mutacije nisu prijavljivane. Danas su poznate brojne metode za

detekciju LGR-ova u različitim genima od kojih se MLPA metoda (*MRC Holland*) najčešće koristi u detekciji mutacija u *BRCA* genima.

Veliki broj prijavljenih genskih rearanžmana u *BRCA* genima je jedinstven i kao posledicu ima prekid sinteze proteina. Najčešće su duplikacije i delecije jednog ili više egzona, ali su prijavljene i triplikacije, kao i kombinovane delecije i insercije (Mazoyer, 2005). Mutirani regioni variraju u veličini od 510 nukleotida (delecija egzona 22 *BRCA1* gena) do 160 880 nukleotida (delecija egzona 1-22 *BRCA1* gena). S obzirom da dovode do prekida sinteze proteina ne očekuje se da fenotipski efekat ovih mutacija bude drugačiji u odnosu na druge štetne mutacije. Veliki genski rearanžmani su odgovorni za do 30% *BRCA1* štetnih mutacija u određenim populacijama, dok je taj procenat kod *BRCA2* niži. Veruje se da udeo rearanžmana ne bi trebao mnogo da varira medju populacijama, osim u slučajevima kada je efekat osnivača uticao na povećanje učestalosti određenog alela u nekoj od populacija. Pojedine velike delecije i duplikacije u *BRCA1* genu su prijavljene kao osnivačke u nekim populacijama, pa je delecija egzona 13 ili egzona 22 zastupljena sa 23% od svih *BRCA1* mutacija u Holandiji (Hogervorst i sar., 2003). Iako su rearanžmani u *BRCA2* redji, u Portugaliji je osnivačka mutacija c.156_157insAlu, odgovorna za četvrtinu mutacija u ovom genu (Sluiter i van Rensburg, 2011). Unapredjivanje tehnika za detekciju LGR-ova dovelo je i do otkrića delecije celog *BRCA1* gena. Ova mutacija je do sada detektovana u ukupno tri slučaja (de la Hoya i sar., 2006; Konecny i sar., 2008), dok je u jednom od njih 2011. godine, utvrđena *de novo* delecija celog *BRCA1* gena, i to kod pacijentkinje sa ranim bilateralnim karcinomom dojke, a bez prethodne porodične istorije bolesti (Garcia-Casado i sar., 2011).

Objašnjenje nastanka LGR-ova u *BRCA1* genu najverovatnije leži u njegovoj strukturi čiju skoro polovinu čine *Alu* sekvence, za koje se zna da učestvuju u nastanku rearanžmana (Batzer i Deininger, 2002). Stoga ne iznenadjuje činjenica da je najmanje 81 različit rearanžman prijavljen upravo u *BRCA1* genu, dok je znatno manji broj otkriven u *BRCA2* genu koji u svojoj strukturi sadrži manje *Alu* sekvenci (Sluiter i van Rensburg, 2011). *Alu* elementi su ~300 bp dugački ponovci, najčešće se nalaze u intronima, 3'UTR regionima gena kao i intergenskim regionima, i zajedno sa drugim mobilnim elementima čine preko 45% humanog genoma (Batzer i Deininger, 2002). Za LGR-ove koji nisu

uključivali *Alu* sekvence, dalja ispitivanja su pokazala njihov nastanak rekombinacijom sa *BRCA1* pseudogenom (ψ *BRCA1*), koji je lociran 28kb uzvodno od *BRCA1* gena (Puget i sar., 2002). Uzimajući u obzir gradju *BRCA1* gena, verovalo se da će veliki genski rearanžmani predstavljati značajan deo *BRCA1* mutacija, i da će uspeti da objasne veliki deo njegovog mutacionog spektra. Ali, ukoliko se ne uzmu u obzir osnivačke mutacije u određenim populacijama, LGR-ovi u *BRCA1* nisu zastupljeni ni približno koliko se očekivalo. Jedno od mogućih objašnjenja može biti postojanje mehanizma koji rezultuje u efikasnoj supresiji rekombinacije uzrokovane *Alu* ponovcima (Mazoyer, 2005). Najveći broj LGR-ova u *BRCA1* genu su delecije (oko 79%), a samo jedna insercija i jedna triplikacija su pronadjene u ovom genu (Sluiter i van Rensburg, 2011). Otkriven je i veliki broj duplikacija, kao i kombinovanih insercija i delecija.

Udeo LGR-ova u *BRCA1/2* genima varira u različitim populacijama. Najveća učestalost velikih genskih rearanžmana u *BRCA1* prijavljena je u Holandiji (27-36%) (Petrij-Bosch i sar., 1997; Hogervorst i sar., 2003) i u Italiji, gde je prijavljeno 12/653 mutacija u *BRCA1* genu (19%) (Agata i sar., 2006). U Danskoj je prijavljeno i do 12,5% ovakvih promena u *BRCA1* (Hansen i sar., 2009), mada postoje studije iz ove populacije koje su pokazale i manji udeo (~3%) (Thomassen i sar., 2006). U Francuskoj su ovi rearanžmani relativno česti i čine 9,5% (4/42) (Gad i sar., 2002), kao i u Španiji gde čine 8,2% od svih štetnih varijanti *BRCA1* gena (de la Hoya i sar., 2006). Ova španska studija je pokazala i prisustvo velikog broja populaciono specifičnih osnivačkih mutacija. Oni su potvrdili stav da su LGR-ovi u *BRCA1* ekvivalentni malim mutacijama u smislu rizika za karcinom, i da su veliki rearanžmani češći kod porodica sa karcinomom dojke i jajnika u istoriji (8%), u odnosu na porodice sa prisutnim samo karcinomom dojke (1,3%). U Nemačkoj je udeo rearanžmana u *BRCA1* oko 8% (Hartmann i sar., 2004), u Češkoj 6% (Vasickova i sar., 2007), u Poljskoj 3,6% (Rudnicka i sar., 2013), a u Sloveniji je udeo rearanžmana u *BRCA1* genu 0,8% (4/524) (Stegel i sar., 2011). U Finskoj, mutacije ovog tipa nisu pronadjene (0/82) (Lahti-Domenici i sar., 2001), kao ni u francuskom delu Kanade (0/154) (Moisan i sar., 2006).

LGR mutacije u *BRCA2* genu su redje i do danas je otkriveno ukupno njih 17. Delecije čine 53%, a po 12% čine insercije i duplikacije (Sluiter i van Rensburg, 2011).

Samo jedna od svih *BRCA2* mutacija je osnivačka. To je, već pomenuta, insercija *Alu* sekvence u egzonu 3, i identifikovana je u najmanje 32 porodice u Portugaliji (Peixoto i sar., 2009). LGR-ovi u *BRCA2* genu nisu pronadjeni u Kanadi (Moisan i sar., 2006), Finskoj (Lahti-Domenici i sar., 2001; Pylkäs i sar., 2008), Nemačkoj (Preisler-Adams i sar., 2006), Poljskoj (Rudnicka i sar., 2013), a nisu pronadjeni čak ni u Holandiji gde su *BRCA1* rearanžmani najučestaliji (Peelen i sar., 2000). S obzirom da su promene u *BRCA2* genu češće kod porodica sa slučajevima muškog karcinoma dojke veruje se da je i udeo LGR-ova u ovim porodicama veći.

U okviru ovog istraživanja analizirali smo prisustvo LGR-ova u *BRCA1* i *BRCA2* genima kod 53 osobe iz porodica sa istorijom karcinoma dojke i jajnika, i ovo je bila prva studija tog tipa u Srbiji. Nije pronadjena nijedna promena u oba gena ukazujući na to da veliki genski rearanžmani ne doprinose mutacionom spektru *BRCA1/2* gena u ispitivanoj grupi. Nedostatak mutacija ovog tipa u *BRCA2* genu je u skladu sa rezultatima prethodno objavljenih studija, ali mutacije u *BRCA1* genu su ipak učestalije u drugim ispitivanim grupama. Činjenica da pored malih promena u *BRCA1/2* genima, ni LGR-ovi nisu pronadjeni u grupi naslednog karcinoma dojke, može da ukaže na postojanje drugih genskih varijanti koje doprinose riziku za oboljevanje u ispitivanoj grupi. Nedostatak velikih genskih rearanžmana ukazuje nam i na to da, u mutacionom spektru *BRCA1* i *BRCA2* gena u Srbiji, najveći udeo najverovatnije imaju male promene u ovim genima. Stoga će i PCR-zasnovano sekvenciranje celih *BRCA1* i *BRCA2* gena visokorizičnih porodica u Srbiji kojim se mogu detektovati manje mutacije, biti dovoljno senzitivno, tj. moći će da pokrije najveći deo mutacionog spektra ovih gena. Ipak, ne treba isključiti mogućnost pronalaska velikih genskih rearanžmana u *BRCA1/2* genima u Srbiji proširenjem ispitivane grupe. Pronalaskom većeg broja visoko rizičnih porodica sa negativnim rezultatom na male promene u *BRCA1/2* genima, omogućićće nam proširenje ispitivane grupe kao i kompletniji uvid u prisustvo velikih genskih rearanžmana u njima, pa ove prve rezultate treba uzeti kao smernice za dalja istraživanja.

5.2. *TP53* i KARCINOM DOJKE

TP53 je identifikovan 1979. godine, a danas se zna da je on najčešće mutiran gen u humanim tumorima. Germinativne mutacije u *TP53* genu su retke i povezane su sa nastankom *Li-Fraumeni* sindroma (LFS), u okviru koga je *TP53* mutiran u više od 70% slučajeva (Walerych i sar., 2012). Iako LFS doprinosi ukupnom karcinomu dojke sa samo ~0,1% (Apostolou i Fostira, 2013), nosioci mutacija u *TP53* genu imaju i do 6 puta povećan rizik za oboljevanje od ranog karcinoma dojke u odnosu na opštu populaciju, što svrstava ovaj gen u red visoko penetrabilnih. Karcinom dojke je najčešći malignitet kod žena nosilaca *TP53* mutacija, sa oko 5% slučajeva dijagnostikovanih pre 30. godine života. Iako su mutacije u ovom genu najčešće posmatrane i ispitivane u okviru LFS, skorašnje studije LFS nezavisnih, ranih karcinoma dojke ukazuju na značajniju zastupljenost mutacija u *TP53* genu nego što se prvobitno očekivalo (Mouchawar i sar., 2010).

Prema bazi Internacionalne agencije za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer- IARC*), ~70% mutacija u *TP53* genu su po tipu *missense*. Mutacije u *TP53* genu u karcinomu dojke se grupišu u kodonu 220 (3,6%), dok je u drugim kancerima procenat mutacija na ovom mestu manji (2%). Slično je i sa kodonom 163, jer se mutacije u njemu javljaju sa 2% u karcinomu dojke a manje od 1% u drugim karcinomima (Walerych i sar., 2012). Iako ne postoji objašnjenje ovih razlika, pretpostavlja se da geografske i etničke karakteristike mogu doprineti pojavi specifičnih mutacija. Postoje i podaci koji pokazuju da su somatske *TP53* mutacije češće kod karcinoma dojke izazvanih *BRCA1* i *BRCA2* mutacijama, nego kod sporadičnih oblika (Greenblatt i sar., 2001). Zanimljivo je pomenuti i da je *TP53* mutiran u velikom broju tipičnih medularnih karcinoma, pogotovu zato što ovaj tip tumora deli kliničko-patološke karakteristike sa *BRCA1* zavisnim karcinomima (de Cremoux i sar., 1999).

5.2.1. *TP53* mutacije i rani karcinom dojke

Iako se veliki broj istraživanja mutacionog statusa *TP53* gena bazira na ispitivanju porodica i pojedinaca koji zadovoljavaju kriterijume *Li-Fraumeni* sindroma, pokazano je

postojanje *TP53* mutacija u slučajevima ranog karcinoma dojke i izvan tradicionalne kliničke definicije ovog sindroma (Mouchawar i sar. 2010). Ovde je upravo mutacijama u ovom genu pripisano čak 5% nasledne predispozicije, sa zapažanjem da je broj slučajeva izazvan mutacijama u *TP53* bio skoro isti kao i onih izazvanih mutacijama u *BRCA2*. Studija Lalloo i Evans (2006) je prijavila 4% udeo patogenih mutacija u *TP53* kod ranog karcinoma dojke, pri čemu je većina pacijenata imala i druge malignitete. Time je ukazano na činjenicu da dijagnoza drugih primarnih maligniteta treba da ukaže na moguće postojanje štetnih mutacija u *TP53*. Iako se najveći broj mutacija javja u 5-8. egzonima *TP53*, pokazano je da upravo 8. egzon predstavlja najbitniji indikator za rani karcinom dojke, kao i da pacijenti sa mutacijama u ovom egzonu imaju 6 puta veću verovatnoću da obole od ranog karcinoma dojke (OR=6.48, 95% CI=1.37-30.6) (Lai i sar. 2002). Postoji više mogućih razloga zašto bi mutacije baš u 8. egzonu bile najznačajnije za nastanak karcinoma. Region između kodona 280 i 285 egzona 8, kodira H2 α heliks (amino kiseline 278-286). Ove amino kiseline grade proteinski motiv (eng. *loop-sheet-helix*) koji je odgovoran za pakovanje H2 α heliksa. Ovo ukazuje da izmenjena konformacija heliksa može igrati važnu ulogu u promociji tumorigeneze. Drugo moguće objašnjenje je i da u poređenju sa egzonima 5-7, egzon 8 odgovara amino kiselinama bližim C terminusu humanog TP53 proteina gde se nalazi grupa od tri NLS sekvence. Ovaj region je odgovoran za migraciju TP53 proteina u jedro ćelije, pa mutacije u njemu mogu onemogućiti ovaj proces. Takođe je pokazano da C terminalni peptid poreklom od TP53 indukuje brzu apoptozu u ćelijskim linijama karcinoma dojke (Kim i sar., 1999). Mutacije u tom regionu mogu imati značajniji uticaj na normalno funkcionisanje TP53 proteina. Jedna od funkcija TP53 je transkripciona aktivacija gena koji kodiraju značajne inhibitore ćelijskog rasta, apoptotske gene, kao i *MDM2* gen. C terminalni region TP53 koji kodira egzon 8, modulira podložnost TP53 proteina za MDM2 zavisnu degradaciju, pa bi mutacije u egzonu 8 verovatno inhibirale ovaj proces.

Germinativne mutacije u *TP53* genu kod kavkazijanaca su vrlo retke i procenjuju se na do 5% (Ginsburg i sar., 2009; Mouchawar i sar., 2010), i to kod porodica koje zadovoljavaju LFS kriterijume. Kod porodica nezavisnih od LFS-a, ovaj udeo je značajno manji. Što se tiče drugih rasa, skorašnja kineska studija je pokazala učestalost *TP53*

mutacija od 1,3% kod 76 uzoraka karcinoma dojke dijagnostikovanih pre 35. godine života (Cao i sar., 2010). Iako postoje podaci da žene iz Indije i Pakistana češće oboljevaju od ranog karcinoma dojke, kod njih ipak nije pronađena veća učestalost mutacija u *TP53* genu (Rashid i sar., 2012).

U našoj studiji smo želeli da ispitamo prisustvo germinativnih mutacija u 8. egzonu *TP53* gena u grupi naslednog karcinoma dojke, kod pacijentkinja kod kojih se bolest javila pre 40. godine života. Cilj nam je bio da ispitamo opravdanost testiranja prisustva mutacija u *TP53* genu kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke iz porodica nezavisnih od *Li-Fraumeni* sindroma, a kod kojih štetne mutacije u *BRCA1* i *BRCA2* genima nisu pronađene. Testirani pacijenti su izabrani iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika, što znači da su imali porodičnu istoriju karcinoma dojke/jajnika, i da su negativni na štetne mutacije u *BRCA1* i *BRCA2* genima. Kod 21 osobe koje su činile ovu grupu nismo pronašli štetne germinativne mutacije u 8. egzonu *TP53* gena. S obzirom da su germinativne mutacije u *TP53* genu vrlo retke izvan okvira *Li-Fraumeni* sindroma, naš rezultat je u skladu sa očekivanim i prethodno prijavljenim rezultatima. Walsh i saradnici (2006) su ispitivali 300 slučajeva karcinoma dojke sa porodičnom istorijom bolesti koji su bili *BRCA1/2* negativni, i pronašli su tri mutacije u *TP53* genu (1%), i to samo kod porodica koje zadovoljavaju LFS kriterijume. Kod 21 porodice nezavisne od *Li-Fraumeni* sindroma, oni nisu pronašli nijednu mutaciju u *TP53* genu kod osoba mlađih od 35 godina. Iako je naš rezultat bio u skladu sa očekivanjima ipak ga treba uzeti samo kao preliminarni s obzirom na veličinu ispitivanog uzorka i činjenicu da nije ispitan ceo kodirajući region gena, pa ne možemo isključiti mogućnost postojanja mutacija u drugim regionima *TP53*. Da bi se doneo definitivni zaključak trebalo bi uraditi ekstenzivniji mutacioni skrining i sekvencirati svih 10 kodirajućih egzona, egzon-intron granica, kao i promotorskih regiona *TP53*.

Iako mutacije u *TP53* genu mogu da doprinesu razvoju ranog karcinoma dojke sa mnogo većom učestalošću nego što se ranije mislilo, većina studija ipak nije uspela da dokaže opravdanost rutinskog testiranja na prisustvo mutacija u *TP53* genu kod *Li-Fraumeni* nezavisnih porodica. Medjutim, značaj ovog visoko penetrabilnog gena, i činjenica da je rizik za razvoj kancera kod nosilaca mutacija u *TP53* veći od 90% (Walsh i

sar., 2006), predstavljaju imperativ daljeg istraživanja promena u ovom genu u svetlu naslednog karcinoma dojke.

5.2.2. Polimorfizam Arg72Pro *TP53* gena i rizik za karcinom dojke

Iako veliki broj SNPova nema štetan efekat, dešava se da neki od njih doprinose riziku za nastanak kancera narušavajući normalnu funkciju *TP53* proteina. Efekat određenog polimorfizma pojedinačnih nukleotida se može ogledati u uzrokovanju ranijeg razvoja bolesti, ili povećanju rizika za njen razvoj (Whibley i sar., 2009). S obzirom da efekti SNP-ova mogu biti suptilni i varirati u odnosu na genetičko poreklo, postoje ozbiljni izazovi za utvrđivanje njihovog efekta na razvoj kancera.

Na osnovu prethodnih saznanja trenutno važi stav da je Arg72 forma *TP53* gena efikasnija u indukciji apoptoze od Pro72 varijante (Whibley i sar., 2009). Povezanost između Arg72Pro polimorfizma i nastanka karcinoma dojke je ispitivana u mnogim populacijama ali su njihovi rezultati međusobno suprotstavljani. Dok neki radovi prijavljuju Pro/Pro formu kodona 72 kao faktor rizika za karcinom dojke i rani karcinom dojke (Al-Qasem i sar., 2012; Proestling i sar., 2012), drugi su Arg/Arg homozigotni genotip povezali sa značajnim povećanjem rizika za karcinom dojke (Ohayon i sar., 2005; Damin i sar., 2006). Sa druge strane, postoje studije i veće meta-analize koje ne pronalaze postojanje veze Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena sa karcinomom dojke (Costa i sar., 2008; Zhuo i sar., 2009). Postoje i istraživanja koja pokazuju da Pro/Pro genotip negativno utiče na interval bez ponovne pojave bolesti, naročito kod pacijenata koji su primali adjuvantnu hemioterapiju, pa se može pretpostaviti da kodon 72 *TP53* gena može biti marker predviđanja odgovora na hemioterapiju u karcinomu dojke (Toyama i sar., 2007). Postoji nekoliko mogućih razloga zašto iste polimorfne varijante pokazuju različite efekte u različitim populacijama. Pored razlika u definisanju grupa i veličine ispitivanog uzorka, na ove rezultate može da utiče i struktura populacije kao i evolutivni faktori koji su delovali na nju (genetički drift, efekat osnivača...). Ovi faktori su odgovorni za postojanje razlika u učestalosti alela koje se danas uočavaju među različitim populacijama. Čak i kada bismo pretpostavili da će česti aleli u osnovi delovati slično u različitim etničkim grupama

(smanjivati ili povećavati rizik za oboljevanje), mnoge od njih je praktično nemoguće pronaći u onim grupama kod kojih su takvi aleli retki. Takođe, dešava se da su neke varijante karakteristika samo određenih populacija pa se kod njih treba usmeriti na istraživanje takvih varijanti. Genetičke varijante mogu imati različit efekat u populacijama i zbog toga što na njih mogu da deluju brojni faktori spoljašnje sredine. Pored toga što je teško pratiti efekat poznatih faktora spoljašnje sredine na rizik za nastanak bolesti, verovatno postoje i brojni nepoznati faktori koji bi mogli da utiču na penetrabilnost genetičkih varijanti.

Ovom studijom ispitivali smo vezu *TP53* Arg72Pro polimorfizma sa nastankom naslednog karcinoma dojke kao i karcinoma dojke neodređenog u odnosu na porodičnu istoriju bolesti kod pacijentkinja iz Srbije. Dobijene učestalosti Arg alela (74,5%) i Pro alela (25,5%) se ne razlikuju značajnije od prijavljenih u evropskim populacijama. Ispitali smo i vezu ovog polimorfizma sa nastankom ranog karcinoma dojke u obe grupe. Odnos verovatnoće (OR) je ukazao na značajnost Pro alela za oboljevanje od ranog karcinoma dojke u obe grupe (nasledni i sistematski), ali intervali poverenja (CI) nisu potvrdili statističku značajnost. Rezultati su pokazali značajnu vezu 72Pro alela kod pacijentkinja sa porodičnom istorijom bolesti u odnosu na grupu nezavisnu od porodične istorije. U sistematskom karcinomu se Arg alel pokazao kao značajniji (Tabela 37).

Tabela 37. Asocijacija Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena sa karcinomom dojke (*rezultat je statistički značajan)

GRUPE	<i>TP53</i> Arg72Pro	(OR; 95%CI)
nasledni vs. kontrolni uzorak	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(1,66; 0,84-3,30)
nasledni (≤ 40 god.) vs. kontrolni uzorak	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(1,72; 0,68-4,35)
sistematski vs. kontrolni uzorak	Arg vs. Pro	(1,24; 0,78-1,92)
sistematski (≤ 40 god.) vs. kontrolni uzorak	Pro/Pro vs. Arg/Pro+Arg/Arg	(2,35; 0,44-12,54)
nasledni vs. sistematski	Pro/Pro+Arg/Pro vs. Arg/Arg	(2,34; 1,17-4,70)*

Ovim ispitivanjima je utvrđeno da Pro alel Arg72Pro polimorfne varijante *TP53* gena, predstavlja faktor rizika za oboljevanje od karcinoma dojke, naročito nasledne forme bolesti. Dobijeni rezultati ukazuju i na postojanje veze Arg alela sa karcinomom dojke

nezavisnog u odnosu na porodičnu istoriju bolesti, ali je proširenje ispitivane grupe neophodno da bi se potvrdilo ovo zapažanje. U svakom slučaju, rezultati našeg istraživanja Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena u karcinomu dojke ukazuju na njegov značaj u naslednom obliku ove bolesti.

5.2.3. Povezanost Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora

Podaci o povezanosti Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora su malobrojni jer se najveći broj istraživanja na ovu temu svodi na studije slučajeva i kontrola gde se ispituje uticaj određenih polimorfničkih varijanti na nastanak različitih tipova kancera. Mi smo ispitivali i postojanje veze Arg72Pro polimorfizma *TP53* gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora, kao i doprinos ovog polimorfizma prognozi bolesti u sistematskom uzorku karcinoma dojke.

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma dojke u ispitivanom uzorku bila je 52 godine. Iako je postojalo variranje u učestalosti polimorfničkih varijanti u ove dve grupe, ove razlike nisu bile statistički značajne. Slična situacija je bila i u odnosu na status menopauze pacijentkinja, gde takodje nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji polimorfničkih varijanti.

Iako smo primetili veću učestalost Arg/Arg genotipa kod pacijentkinja kod kojih je karcinom bio veći od 2 cm (T2+T3) u odnosu na T1 status tumora (≤ 2 cm) (71% vs. 58,3%) ova razlika ipak nije bila statistički značajna. Sličan rezultat smo dobili i ispitivanjem raspodele polimorfničkih varijanti u grupama invazivnog dukalnog i invazivnog lobularnog karcinoma. Ispitivanjem genotipskih distribucija u grupama nisko i srednje agresivnih karcinoma (G1+G2) u odnosu na agresivne oblike (G3) primetili smo veću učestalost Arg/Arg genotipa u agresivnijim oblicima tumora (72,2% vs. 58,4%) ali uočena razlika nije bila statistički značajna. Ispitivanjem zastupljenosti polimorfničkih varijanti kodona 72 *TP53*

gena u odnosu na status steroidnih receptora kao i Her2 status, nismo pronašli statistički značajnu razliku u njihovim distribucijama. Ni u N statusu (prisustvo/odsustvo metastaza u limfnim čvorovima) nismo pronašli značajniju razliku u distribuciji genotipova kod agresivnih oblika sa prisutnim metastazama (N+) u odnosu na manje agresivne oblike (N0).

Činjenica da nismo pronašli korelaciju između genotipskih distribucija i specifičnih prognostičkih prediktora, ukazuje da polimorfizam kodona 72 *TP53* gena ne utiče na klinički tok bolesti. Ovaj rezultat je u skladu sa dobijenim u literaturi (Rodrigues i sar., 2011). Ipak će definitivni zaključak uticaja ovog polimorfizma na ishod karcinoma dojke zavisiti od dužeg praćenja toka bolesti pacijenata i njihovog ukupnog preživljavanja. S obzirom da je biološki razvoj karcinoma dojke okarakterisan i kasnim razvojem metastaza, praćenje toka bolesti duže od 10 godina je neophodno da bi se pravilno procenili prognostički faktori ovog maligniteta.

5.3. *CHEK2* i KARCINOM DOJKE

U 2002. godini je pronađen prvi gen koji doprinosi umerenom riziku za karcinom dojke- *CHEK2* (Vahteristo i sar., 2002). Nosioci štetnih mutacija u njemu imaju i do 40% životni rizik za oboljevanje od karcinoma dojke (Apostolou i Fostira, 2013). Iako je prvobitno *CHEK2* gen bio povezan sa nastankom *Li-Fraumeni* sindroma (*LFS* gen) (Bell i sar., 1999), kasnije su dodatne mutacije u *CHEK2* pronađene i izvan okvira ovog sindroma. Potraga za jednom od mutacija (1100delC) u velikim grupama *BRCA1/2* negativnih naslednih karcinoma dojke u Holandiji, Velikoj Britaniji i Severnoj Americi (Meijers-Heijboer i sar., 2002), otkrila je njenu učestalost od 5% među obolelima, nasuprot 1% među zdravim ispitanicima. Kroz genetičke studije vezanosti je kasnije dokazano da upravo ovaj alel *CHEK2* gena doprinosi povećanju rizika za karcinom dojke (Hollestelle i sar., 2010), što je predstavljalo osnovu za daju analizu kompletnog kodirajućeg regiona *CHEK2* u potrazi za dodatnim varijantama.

5.3.1. *CHEK2* 1100delC

CHEK2 1100delC je *frameshift* mutacija koja se dešava na početku 10. protein-kodirajućeg egzona i rezultuje u formiranju *stop* kodona na poziciji 381, u sredini kinaznog domena proteina. Ova mutacija je dospela u žižu interesovanja 2002. godine, kada je kao osnivačka mutacija prepoznata kao prvi nisko penetrabilni alel povezan sa nastankom karcinoma dojke (Vahteristo i sar., 2002).

Veća učestalost 1100delC mutacije je primećena kod slučajeva sa pozitivnom porodičnom istorijom, a naročito kod onih osoba koji su imali obolele prve srodnike (Meijers-Heijboer i sar., 2002; *CHEK2* Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004). Rizik za oboljevanje se povećava i sa brojem obolelih srodnika nosilaca mutacije. Nosioци 1100delC imaju i povećan rizik za bilateralni karcinom dojke (Nevanlinna i Bartek, 2006), a ukazano je i na vezu ove mutacije sa muškim karcinomom dojke čiji je rizik kod nosilaca povećan i do 10 puta u odnosu na opštu populaciju (Meijers-Heijboer i sar., 2002; Gutiérrez-Enríquez i sar., 2007). 1100delC mutacija je povezana sa 2 puta povećanim rizikom za oboljevanje od karcinoma dojke (Nevanlinna i Bartek, 2006), kao i karcinoma dojke u ranijem životnom dobu (*CHEK2* Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004). Skorašnje istraživanje opisuje i porodice sa homozigotnom 1100delC mutacijom (Adank i sar., 2011). Za žene sa mutacijom u homozigotnom obliku se procenjuje da imaju 6 puta povećan rizik za karcinom dojke u poredjenju sa heterozigotima, a uočeno je i povećanje rizika za druge karcinome kao što je kolorektalni karcinom (Adank i sar., 2011; Apostolou i Fostira, 2013). Ova mutacija je povezana i sa ER+, kao i sa visoko-gradusnim karcinomima. Nosioци 1100delC imaju lošije ukupno preživljavanje (Muranen i sar., 2011), kao i lošije desetogodišnje preživljavanje bez pojave bolesti (Gutiérrez-Enríquez i sar., 2007).

Pojava 1100delC mutacije varira u odnosu na ispitivane populacije, pa je njena učestalost u studijama iz Centralne i Istočne Evrope niska čak i u visoko rizičnim porodicama (<1%) (Offit i sar., 2003; Jekimovs i sar., 2005; Margolin i sar., 2007). Najčešća je u severno evropskim zemljama kao što su Finska (1,3%) i Holandija (0,99%), najmanje je zastupljena u Australiji (0,14%) i Nemačkoj (0,19%), a srednje je zastupljena u

Velikoj Britaniji (0,52%) (CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004). U Poljskoj je učestalost 1100delC mutacije oko 0,25% (Cybulski i sar., 2004), u Češkoj 0,3% (Kleibl i sar., 2005), u Americi 0,3-0,4% (Offit i sar., 2003), a u studiji u Španiji nije pronađena (Osorio i sar., 2004).

Naši rezultati ispitivanja prisustva 1100delC mutacije *CHEK2* gena u grupi osoba iz visokorizičnih porodica bili su u skladu sa očekivanjima i prethodno objavljenim rezultatima. S obzirom da je 1100delC mutacija osnivačka u severno-evropskim populacijama koje su geografski udaljene od Srbije, a i činjenica da ova mutacija nije pronađena sa visokom učestalošću u geografski bliskim zemljama, navelo nas je da ne očekujemo značajniju učestalost ove promene u našoj populaciji. U grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika nismo je pronašli kod svih 57 ispitanika, što vodi zaključku da je 1100delC mutacija *CHEK2* gena retka kod visokorizičnih porodica u Srbiji. Njen nedostatak se može pripisati veličini ispitivanog uzorka, ali isto tako može biti objašnjen geografskom i reproduktivnom udaljenošću od populacija kod kojih je mutacija pronađena. Stoga se njena veća učestalost ne očekuje u populaciji u Srbiji, čak ni sa povećanjem ispitivanog uzorka.

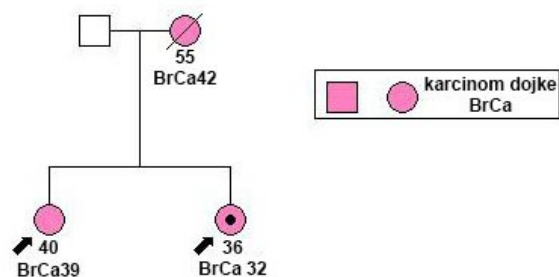
5.3.2. *CHEK2* Del5395

Godine 2006. u Americi je otkrivena velika delecija egzona 9 i 10 u *CHEK2* (Del5395) kod dve porodice poreklom iz Češke i Slovačke (Walsh i sar., 2006). S obzirom na poreklo obe porodice, testiranje je prošireno na sve pacijente i zdrave osobe poreklom iz ovih država. Delecija je bila prisutna kod 1,3% obolelih iz Praga, 0,57% iz Brna i 1,2% iz Bratislave, dok nijedna mutacija nije pronađena kod zdravih kontrola. Dalje analize su ukazale da je ova mutacija nastala na istom haplotipu ukazujući jedinstveno poreklo mutacije, negde u zapadnom regionu Karpata, na granici današnjih republika Češke i Slovačke. Tačna geografska i etnička distribucija ove mutacije još uvek nije utvrđena.

Kao i 1100delC, velika delecija 5395bp vodi nastanku stop kodona na poziciji 381, ali za razliku od 1100delC gde su svi egzoni očuvani, Del5395 eliminiše egzone 9 i 10. S obzirom da se Poljska graniči sa Češkom i Slovačkom, kao i činjenica da stanovnici tih

zemalja imaju slovensko poreklo, podstaklo je analize prisustva ove mutacije i u Poljskoj. Godinu dana nakon njenog otkrića, Del5395 je prijavljena kao osnivačka mutacija u poljskoj populaciji (Cybulski i sar., 2007). Pored njenog mogućeg doprinosa u razvoju karcinoma dojke, pronađena je sa velikom učestalošću i kod karcinoma prostate. Procenjeno je da doprinosi 1,8 puta povećanom riziku za karcinom prostate, a čak i do 4 puta kod familijarnih oblika ove bolesti (Cybulski i sar., 2006).

S obzirom da je Del5395 osnivačka mutacija u slovenskim zemljama kao što su Poljska, Češka i Slovačka, očekuje se i njeno prisustvo u drugim slovenskim populacijama, kao i zemljama balkanskog i baltičkog regiona. Stoga smo i mi bili zainteresovani da ispitamo prisustvo ove mutacije u našoj grupi visokorizičnih porodica. Dodatno nas je na to naveo pronalazak delecije 9. egzona *CHEK2* gena kod jednog ispitanika iz ove grupe, dok smo ispitivali prisustvo velikih genskih rearanžmana u *BRCA1/2* genima MLPA metodom. Ono što smo posumnjali da je bila delecija 9. egzona *CHEK2* gena je u stvari bila delecija oba egzona (9 i 10). Sumnju smo i potvrdili alelski specifičnim PCR testiranjem, a kasnije i sekvenciranjem. Del5395 smo pronašli kod jedne osobe, i utvrdili njenu učestalost od 1,7% u grupi visokorizičnih ispitanika koji vode poreklo iz porodica sa većim brojem obolelih od karcinoma dojke/jajnika. Osoba kod koje smo pronašli mutaciju je obolela od ranog karcinoma dojke (32. godina) i imala je dva slučaja karcinoma dojke u prvostepenom srodstvu (sestra u 39. godini i majka u 42. godini) (Slika 37). Kod sestre nije pronađena Del5395 mutacija.



Slika 37. Porodična istorija nosilaca Del5395 mutacije u *CHEK2* genu

Iako je učestalost Del5395 mutacije u našoj grupi (1,7%) bila veća u odnosu na prethodno prijavljene, s obzirom na veličinu ispitivanog uzorka još uvek ne možemo govoriti o populacionoj učestalosti ove mutacije u Srbiji. Ipak, činjenica da je pronađena i u relativno malom uzorku, ne dozvoljava nam da je odbacimo kao značajnu za našu populaciju. Proširenje uzorka je neophodno da bi se dobila jasna slika učestalosti ove mutacije u Srbiji, i da bi se utvrdilo da li je Del5395 mutacija osnivačka u našoj populaciji.

5.4. *RAD51C*, *RAD51* i KARCINOM DOJKE

S obzirom na značaj RAD51 proteina i njegovih paraloga u procesu homologe rekombinacije, ne iznenadjuje činjenica da mutacije u njima mogu dovesti do nastanka kancera. Inhibicija HR kod miševa ukazuje na zapanjujuće sličnosti u fenotipovima uzrokovanim *BRCA1/2* i *RAD51* inaktivacijom: smrt embriona, osetljivost na DNK oštećujuće agense, akumulacija nepopravljenih dvolančanih prekida i hromozomske aberacije (Suwaki i sar., 2011). Iako još uvek nisu poznate štetne mutacije u *RAD51* genu, SNP-ovi u nekodirajućim regionima gena su povezani sa nastankom karcinoma dojke (Richardson, 2005). Rezultati brojnih studija polimorfizama u *RAD51* genu u vezi sa karcinomom dojke su često kontradiktorni, i u mnogome zavise od ispitivane populacije i odabranog uzorka.

RAD51C je 2010. predložen kao treći visoko penetrabilni gen odgovoran za karcinom dojke (Meindl i sar., 2010). Naizgled kompletna segregacija mutacija ovog gena je u mnogome podsećala na obrazac nasleđivanja mutacija u *BRCA1/2* genima, i predstavljala je prvi dokaz visoke penetrabilnosti *RAD51C*. U toj studiji je ispitivano 1 100 porodica nemačkog porekla i identifikovano je 6 štetnih mutacija u *RAD51C*. Ove mutacije su pronađene samo kod porodica kod kojih je postojala pojava karcinoma i dojke i jajnika, a nije pronađena kod porodica sa isključivo prisutnim karcinomom dojke, kao ni kod kontrolnih uzoraka. Segregacioni obrazac mutacija u porodicama je bio iznenadjujući - niko od testiranih zdravih članova nije nasledio mutaciju, a svi oboleli koji su bili u prvostepenom srodstvu osobe nosioca mutacije su takodje imali mutaciju. Ovaj obrazac se

razlikovao od onog kod porodica sa mutacijama u drugim srednje penetrabilnim genima, a u mnogome je podećao na obrazac *BRCA1* i *BRCA2* mutacija.

Ovo uzbudljivo otkriće iniciralo je niz studija prisustva *RAD51C* mutacija i njihove uloge u karcinomu dojke u različitim populacijama. Iste godine veći broj studija nije uspeo da ponovi dobijene rezultate. Akbari i saradnici (2010), nisu pronašli štetne mutacije u grupi pacijenata iz Kanade, kao ni Zheng i saradnici (2010) kod 92 američke porodice, dok je studija iz Španije u 492 porodice pronašla samo jednu štetnu mutaciju (0,2%), i to kod pacijentkinje koja je imala Švedsko poreklo (Romero i sar., 2011). Nijednu štetnu mutaciju nisu prijavili ni Lu i saradnici (2012) ispitivanjem 192 porodice u Americi. Svi oni nisu uspeali da potvrde ulogu *RAD51C* germinativnih mutacija u karcinomu dojke koja je bila pokazana prvobitnom studijom. Bilo je i studija koje su prijavile postojanje štetnih mutacija ali sa niskom učestalošću i bez jasne asocijacije sa kliničkim fenotipom (Clague i sar. 2011; Vuorela i sar. 2011; Thompson i sar. 2012).

Medjutim, u 2012. godini se pojavilo još jedno istraživanje koje je podstaklo na razmišljanje. Osorio i saradnici (2012) su u funkcionalnim studijama pronađenih *missense* mutacija potvrdili njihovu značajnost, i ukazali na značaj izvodjenja funkcionalnih analiza kod onih mutacija koje nisu jasno oštećujuće. Ukazali su i na to da je značaj prijavljenih *missense* varijanti u drugim studijama najverovatnije zanemaren, upravo usled nedostatka adekvatnih funkcionalnih analiza koje bi procenile njihovu štetnost. U seriji 785 familija karcinoma dojke i/ili jajnika poreklom iz Španije, pronašli su učestalost *RAD51C* mutacija od 1,3% i to kod porodica sa oba maligniteta. Nakon kompleksnih funkcionalnih analiza, oni su čak predložili i uključivanje skrininga na prisustvo mutacija u *RAD51C* genu u kliničku rutinu, naročito kod porodica sa karcinomima dojke i jajnika u porodičnoj istoriji.

Naša studija nije otkrila prisustvo štetnih mutacija u *RAD51C* genu u grupi osoba poreklom iz porodica sa karcinomima dojke i jajnika u porodičnoj istoriji. Pronašli smo ukupno 5 promena, od kojih su tri bile u nekodirajućim regionima gena: (c.1-118G>A) u promotorskom regionu, (c.1-26C>T) u 5'UTR, i (c.904+34T>C) u intronu. Dve su bile *missense* mutacije: c.790G>A i c.859A>G. Mutacija c.790G>A (p.Gly264Ser) je prethodno prijavljena i okarakterisana (Meindl i sar., 2010; Pelttari i sar., 2011; Thompson i sar., 2012). Ova varijanta je povezana sa karcinomom dojke i pokazana je njena veća učestalost

kod porodica sa karcinomima dojke i jajnika u odnosu na kontrolne uzorke (OR:3,44; 95% CI:1,51-7,80) (Meindl i sar., 2010). Ono što je još značajnije, ova promena je pokazala smanjeno preživljavanje DT40 ćelijskih linija i redukciju formiranja RAD51 grupacija, što je eksperimentalno potvrdilo smanjenje funkcije proteina. Pored veze sa karcinomom dojke postoje i indikacije da ova mutacija ima ulogu i u karcinomu jajnika (Pelttari i sar., 2011; Thompson i sar., 2012). Gly264S smo detektovali samo kod jedne pacijentkinje obolele od karcinoma dojke u 55. godini života. Ona potiče iz porodice sa karcinomima dojke u porodičnoj istoriji, a zabeležen je i slučaj muškog karcinoma dojke u istoj porodici. Druga *missense* mutacija c.859A>G (p.Thr287Ala) je takodje prijavljena u prethodnim studijama (Meindl i sar., 2010; Zheng i sar., 2010; Vuorela i sar., 2011). Iako je *in silico* predikcija značaja ove promene na proteinskom nivou pokazala da ona najverovatnije ne utiče na funkciju proteina (SIFT-tolerišuća, POLYPHEN- možda oštećujuća), eksperimentalna ispitivanja ove promene su pokazala smanjenje funkcije nastalog proteina (Meindl i sar., 2010). Ovo dodatno ukazuje na značaj eksperimentalne potvrde štetnosti mutacije. Njena učestalost se međjutim ipak nije značajnije razlikovala medju pacijentima i kontrolama. Vuorela i saradnici (2011) su je proglasili benignom polimorfnom promenom na osnovu njene učestalosti u zdravim kontrolama. U našoj studiji Thr287Ala mutaciju smo detektovali kod 3 ispitanice od kojih je jedna vodila poreklo iz porodice sa više članova obolelih od karcinoma dojke i jajnika, a dve su bile iz porodica sa većom učestalošću karcinoma dojke.

Iako su prvobitne studije najavile *RAD51C* kao treći visoko penetrabilni gen, nedostatak potvrde u drugim studijama, ukazao je na to da *RAD51C* mutacije i nisu toliko česte kao što se verovalo da će biti. Njihova učestalost se kreće ispod 2% što ga ipak svrstava u red drugih retkih alela (*CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2*...). Moguće objašnjenje niske učestalosti mutacija u *RAD51C* genu je nedostatak velikih grupa pacijenata pogodnih za testiranje, što predstavlja veliko ograničenje posebno uzimajući u obzir njihovu nisku učestalost. Jedno od objašnjenja može biti i nedostatak funkcionih analiza *missense* mutacija koje bi možda otkrile njihovu patogenost i štetan efekat na protein. S obzirom da je većina ovakvih mutacija karakteristika populacija, ohrabreno je izvodjenje funkcionih analiza naročito za prethodno neprijavljene, nove mutacije. Potrebno je takodje posvetiti

pažnju i porodicama sa karcinomima jajnika s obzirom da se prijavljuje veća učestalost mutacija u *RAD51C* kod ovakvih porodica. Zaključak je da, iako je pokazano da *RAD51C* jeste gen koji predisponira za karcinom dojke, mutacije u njemu su ipak retke, a podaci o penetrabilnosti još uvek nedovoljni da bi ga svrstali u visoko penetrabilne gene koji bi bili uključeni u rutinsku dijagnostiku.

5.4.1. *RAD51* 135G>C polimorfizam i rizik za karcinom dojke

S obzirom da se brojni regulatorni elementi vezuju za 5'UTR, veruje se da *RAD51* 135G>C može da utiče na obradu iRNK, regulaciju transkripcije, translacionu efikasnost ili stabilnost iRNK. Supstitucijom G u C na poziciji 135, promotorska aktivnost je značajno povećana i ova promena rezultuje u povećanoj aktivnosti *RAD51* (Hasselbach i sar., 2005).

Rezultati ispitivanja veze ovog polimorfizma sa nastankom karcinoma dojke su kontradiktorni u različitim populacijama. U cilju prevazilaženja ovog problema i sa željom da daju jasniji uvid u problematiku, sprovedjene su meta-analize koje su pokazale značajno povećanje rizika za karcinom dojke kod nosilaca 135C alela *RAD51* gena u homozigotnom stanju (Gao i sar., 2011). Takodje je pokazan i značajno povećan rizik u evropskim populacijama dok kod drugih populacija veza nije pronadjena. U Portugaliji, Costa i saradnici (2007) su potvrdili povećanje rizika za karcinom dojke kod porodica sa istorijom ove bolesti i kod nosilaca C/C genotipa. Ipak, Jara i saradnici (2007), su pokazali asocijaciju *RAD51* 135C/C sa karcinomom dojke ali samo kod osoba koje su bile mlađe od 50 godina i koje su poticale iz *BRCA1* i *BRCA2* negativnih porodica.

RAD51 135G>C se intenzivno proučava i kao modifikator penetrabilnosti mutacija u *BRCA1* i *BRCA2* s obzirom da je 135C varijanta povezana sa povećanim rizikom za karcinom dojke kod nosilaca mutacija u *BRCA2* genu (Levy-Lahad i sar., 2001; Wang i sar., 2001). Iako su postojale studije koje nisu pronašle vezu ovog polimorfizma kod nosilaca *BRCA1* mutacija (Wang i sar., 2001), kontradiktorni rezultati su pokazali da 135C alel ima protektivan efekat u odnosu na razvoj bolesti kod nosilaca 5382insC mutacije u *BRCA1* (Jakubowska i sar., 2003). Nosioci 135C alela u ovom slučaju, imaju skoro dva puta smanjen rizik za karcinom dojke i jajnika u poredjenju sa onima koji su nosioci samo

G alela. Uočene razlike mogu se opisati prirodom *BRCA1* mutacija prijavljenih u dve studije. 5382insC u *BRCA1* rezultuje u nastanku skraćenog proteina koji i dalje sadrži intaktno RAD51 vezujuće mesto, dok mutacija prijavljena u studiji Wang i saradnika (2001), 185delAG, ukida ovo vezujuće mesto što može biti jedno od objašnjenja protektivnog efekta polimorfizma kod nosilaca *BRCA1* mutacija. RAD51 vezujuće mesto mora biti intaktno što će omogućiti 135C formi da poveća aktivnost mutiranog *BRCA1* (Jakubowska i sar., 2003). Ova otkrića ukazuju na značaj *RAD51* polimorfizma kao modifikatora *BRCA1/2* penetrabilnosti. Njegov modifikujući efekat na rizik za karcinom dojke kod *BRCA1* i *BRCA2* nosilaca mutacija može biti značajan u svetlu prevencije i strategija kliničkog praćenja pacijenata.

Iako *RAD51* 135G>C samostalno još uvek nije potvrđen kao faktor koji doprinosi riziku za karcinom dojke i najčešće je izučavan u svetlu modifikacije penetrabilnosti *BRCA1/2* mutacija, mi smo ispitivali asocijaciju ovog polimorfizma sa karcinomom dojke kao samostalnog markera, kod *BRCA1* i *BRCA2* negativnih ispitanika. Ovom studijom ispitivali smo i vezu *RAD51* 135G>C polimorfizma sa nastankom karcinoma dojke neodređenog u odnosu na porodičnu istoriju bolesti. Takodje smo ispitali i vezu ovog polimorfizma sa razvojem ranog karcinoma dojke u obe grupe. S obzirom da je postojala razlika učestalosti C/C genotipa u grupi pacijentkinja (8,30%) u odnosu na kontrolnu grupu (0,90%), posumnjali smo da su nosioci ovog genotipa u povišenom riziku za nastanak nasledne forme karcinoma dojke. Potvrdili smo sumnju dokazavši da nosioci 135C alela u homozigotnoj formi imaju statistički značajano povećan rizik za oboljevanje u grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika (Tabela 38). Kada smo iz ove grupe odabrali obolele mlađe od 40 godina OR vrednost je ukazivala na značajnost ali se ona nije potvrdila. Slično je bilo i kod sistemskog karcinoma iako je razlika u učestalostima C/C genotipova između između pacijenata (4,7%) i kontrola (0,90%) ukazivala na veću značajnost (Tabela 38).

Tabela 38. Asocijacija *RAD51* 135G>C polimorfizma sa karcinomom dojke
(*rezultat je statistički značajan)

GRUPE	RAD51 135 G>C	(OR; 95% CI)
nasledni vs. kontrolni uzorak	C/C vs. C/G+G/G	(10,28; 1,12-94,5)*
nasledni (≤40 god.) vs. kontrolni uzorak	C/C vs. C/G+G/G	(5,38; 0,32-89,44)
sistematski vs. kontrolni uzorak	C/C vs. C/G+G/G	(5,58; 0,64-48,63)
sistematski (≤40 god.) vs. kontrolni uzorak	C/C vs. C/G+G/G	(8,14; 0,48-137,6)

Naši rezultati ispitivanja povezanosti *RAD51* 135G>C polimorfizma sa nastankom karcinoma dojke pokazala su statistički značajnu vezu C/C genotipa sa povećanjem rizika za oboljevanje kod osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom karcinoma dojke/jajnika. Interesantno je da je jedan od rezultata ukazao na povišenje rizika za oboljevanje od karcinoma dojke za nosioce 135C alela u obe grupe kod mlađjih od 40 godina (sa i bez porodične istorije bolesti), što može ukazati na značajnu vezu ovog polimorfizma sa ranim karcinomom dojke.

5.4.2. Povezanost 135G>C polimorfizma *RAD51* gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora

Podataka o povezanosti ovog *RAD51* polimorfizma sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora praktično i nema, jer se najveći broj istraživanja na ovu temu svodi na studije slučajeva i kontrola gde se ispituje uticaj određenih polimorfničkih varijanti na nastanak različitih tipova kancera. Čak i retka ispitivanja asocijacije ovog polimorfizma sa parametrima koji direktno korelišu sa tokom bolesti i preživljavanjem nisu uspela da pronadju značajniju vezu. Tako Krupa i saradnici (2009), nisu pronašli korelaciju ovog polimorfizma sa histološkim tipom karcinoma dojke (duktalni i lobularni), veličinom tumora, kao ni prisustvom receptora za estrogen i progesteron. Pored ispitivanja efekta na nastanak karcinoma dojke, mi smo ispitivali i postojanje veze 135G>C polimorfizma

RAD51 gena sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora, kao i doprinos ovog polimorfizma prognozi bolesti u sistematskom uzorku karcinoma dojke.

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma dojke u ispitivanom uzorku bila je 52 godine. Iako je postojalo variranje u učestalosti polimorfnih varijanti u ove dve grupe, ove razlike nisu bile statistički značajne. Slična situacija je bila i u odnosu na status menopauze pacijentkinja, gde takodje nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji polimorfnih varijanti.

Nismo primetili veću učestalost nekog od genotipova kod pacijentkinja kod kojih je karcinom bio veći od 2 cm (T2+T3) u odnosu na T1 status tumora (≤ 2 cm). Iako smo uočili veću zastupljenost C/C+G/C genotipova kod invazivnog dukalnog karcinoma (20,8%) u odnosu na invazivni lobularni karcinom (14,3%) ova razlika nije bila statistički značajna. Ispitivanjem genotipskih distribucija u grupama nisko i srednje agresivnih karcinoma (G1+G2) u odnosu na agresivne oblike (G3) primetili smo veću učestalost C/C+G/C genotipova u agresivnijim oblicima tumora (27,8% vs. 18,2%) ali uočena razlika nije bila statistički značajna.

Ispitivali smo i zastupljenost genotipova *RAD51* polimorfizma u odnosu na status estrogenih receptora. Uočili smo razliku u učestalosti C/C+G/C genotipova između ER- (28,2%) i ER+ (12,9%) tumora ($\chi^2=3,67$; OR= 2,65; 95% CI=0,96-7,34). S obzirom da se status ER receptora koristi kao prediktivni marker karcinoma dojke i da visok sadržaj receptora ukazuje na bolji odgovor na endokrinu terapiju, negativni receptorski status se povezuje sa lošijim prognozama. S obzirom da smo utvrdili postojanje korelacije sa ER-statusom karcinoma, rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da proteinski produkt kodiran od strane 135C *RAD51* alela može uticati na stepen diferenciranosti tumora. Dobijena je i veća učestalost C/C+G/C genotipova kod PR- karcinoma (26,1%) u odnosu na PR+ (12,7%). Iako ova razlika nije statistički značajna, ukazala nam je, zajedno sa rezultatom vezanim za ER status, da *RAD51* 135G>C polimorfizam može biti povezan sa karakteristikama tumora koje se odnose na prisustvo steroidnih receptora, mada su studije na većem broju uzoraka neophodne da bi se ovo zapažanje potvrdilo. Ispitujući distribucije genotipova ovog polimorfizma među Her2+ i Her2- tumorima, nismo uočili značajniju razliku. Ni u N statusu (prisustvo/odsustvo metastaza u limfnim čvorovima) nismo pronašli

značajniju razliku u distribuciji genotipova kod agresivnih oblika sa prisutnim metastazama (N+) u odnosu na manje agresivne oblike (N0).

I u ovom slučaju će definitivni zaključak uticaja ovog polimorfizma na ishod karcinoma dojke zavisiti od dužeg praćenja toka bolesti pacijenata i njihovog ukupnog preživljavanja.

5.5. *NBS1* i KARCINOM DOJKE

Devet mutacija u kodirajućem regionu *NBS1* gena je pronađeno u heterozigotnom stanju kod pacijenata sa različitim tipovima kancera. 657del5, 511A>G (I171V), 643C>T (R215W) i 742insGG mutacije su pronađene i kod pacijenata sa *Nijmegen Breakage* sindromom (NBS), a i kod pacijenata obolelih od različitih kancera nevezano za ovaj sindrom (di Masi i Antoccia, 2008). 657del5 je najčešća štetna mutacija u *NBS1* genu koja se javlja kod 90% NBS pacijenata i kod 50% *NBS1* heterozigota sa drugim karcinomima. Heterozigoti za ovu mutaciju imaju tri puta povećan rizik za karcinom dojke što ga svrstava u red srednje penetrabilnih gena za ovu bolest. Rizik za karcinom dojke koji se može pripisati drugim *NBS1* varijantama još uvek nije dovoljno proučen. Pored karcinoma dojke, pojava 657del5 je povezana i sa nastankom melanoma, ne-Hoćkinovog limfoma i kolorektalnog karcinoma (di Masi i Antoccia, 2008). Takodje je pokazano da su maligni tumori dva puta češći kod srodnika osoba koji su nosioci 657del5 mutacije. Asocijacija ove mutacije sa rizikom za razvoj karcinoma dojke je pokazana i najnovijom meta analizom (OR=2.66, 95 % CI 1.82–3.90, p<0.001) (Zhang i sar.,2013).

Eksperimentalna potpora tvrdnji da heterozigotne mutacije u *NBS1* genu vode ćeliju u malignitet došla je iz studije u kojoj je ispitan efekat inaktivacije mišjeg homologa *NBS1* gena, *NBN* (Dumon-Jones i sar., 2003). *Nbn*+/- miševi su pokazali značajno povećanu stopu spontanog nastanka solidnih tumora (epitelijalnih tumora koji su pogadjali jetru, prostatu, mlečne žlezde i gonade) kao i limfoma. Dodatno, kod ovih miševa je nastajalo značajno više maligniteta dejstvom jonizujućeg zračenja, a naročito tireoidnih karcinoma. Ovi podaci su pokazali jasnu vezu izmedju mutacija *NBS1* gena u heterozigotnom stanju i senzitivnosti na zračenje, sa povećanim rizikom za razvoj

maligniteta. Interesantno je bilo zapažanje da eksperimentalna ispitivanja nastalih tumora nisu pokazala gubitak *wt* alela što je ukazivalo da je haploinsuficijencija pretpostavljeni patogeni mehanizam. Sa druge strane, kod humanih heterozigota, moguće postojanje okrnjenog proteina koji je produkovan alternativnom translacijom (Maser i sar., 2001) i njegova očuvana interakcija sa MRE11, mogli bi da budu kompatibilni sa dominantno-negativnim mehanizmom.

Ispitivanje *NBS1* 657del5 mutacije u karcinomu dojke nije pokazalo značaj ove mutacije kao prognostičkog faktora. Karcinomi kod pacijenata sa i bez mutacije se nisu razlikovali u odnosu na veličinu tumora, vreme dijagnoze i druge histopatološke karakteristike (Huzarski i sar., 2013). Desetogodišnje preživljavanje žena sa *NBS1* mutacijom (81,2%, 95%CI: 70,1-94,1) je bilo slično kao i kod onih bez prisutne mutacije (79,4%, 95%CI: 78,0–80,9%). Izgleda da je uticaj 657del5 mutacije na razvoj karcinoma kod muškaraca znatno veći. Pokazano je i da su karcinomi prostate kod nosilaca mutacije agresivniji, i da otprilike polovina pacijenata sa ovim alelom umire u roku od 5 godina od postavljanja dijagnoze. U poredjenju sa muškarcima bez ove promene, relativna stopa preživljavanja posle 5 godina bila je 48% (Cybulski i sar., 2004; Huzarski i sar., 2013).

Geografska distribucija 657del5 alela *NBS1* gena nije unifromna. On je najzastupljeniji kod slovenskih populacija u istočnoj Evropi gde je odgovoran za otprilike 1% svih pacijenata sa karcinomom dojke. Najveći broj istraživanja i dolazi upravo iz ovih regiona. Prvo istraživanje je pokazalo visoku učestalost 657del5 alela u tri slovenske populacije Češkoj, Poljskoj i Ukrajini (1/177) (Varon i sar., 2000). Kasnije je povišena učestalost potvrđena u pojedinačnim studijama iz ovih zemalja. Górski i saradnici (2003) su pokazali povećanu učestalost *NBS1* 657del5 mutacije i kod sistematskog uzorka karcinoma dojke ali dijagnostikovanog pre 50. godine (2/150; 1,3%), i kod familijarnog oblika karcinoma dojke (3/80; 3,7%) u severo-zapadnim regionima Poljske. Većina ovih ispitanika je imala pozitivnu istoriju karcinoma dojke u prvostepenom srodstvu. U opštoj populaciji su takodje pronašli ovu mutaciju kod 3 od 530 ispitanika (0,6%). Dalje su pokazali gubitak heterozigotnosti na *NBS1* lokusu u tumorima kod svih pacijenata sa ovom mutacijom, a dodatnim haplotipskim analizama su utvrdili da se gubitak alela odnosio isključivo na *wt* alel. Ova istraživanja su ukazala da je 657del5 mutacija najverovatnije

povezana sa nastankom karcinoma dojke a posebno sa naslednom formom bolesti ali da slično kao i *CHEK2*, pokazuje srednju penetrabilnost. I studija iz Centralne Poljske je potvrdila značaj ove mutacije gde je prijavljena njena učestalost od 1,96% (11/562) (Steffen i sar., 2006). Većina nosilaca mutacije je imala porodičnu istoriju karcinoma dojke/jajnika. Rizik za oboljevanje kod nosilaca mutacija je bio najveći za mladje od 40 godina (OR: 8,36; 95%CI: 2,57–27,27), a nešto manji za mladje od 50 godina (OR: 4,27; 95%CI: 1,67–10,89). Rezultati poreklom iz severnih i istočnih regiona Poljske su pokazale nižu učestalost ove mutacije. U grupi od 250 pacijenata, 657del5 alel je detektovan kod 2 slučaja (0,8%) (Kanka i sar., 2007). Oba pacijenta su imala porodičnu istoriju karcinoma dojke. Ovi rezultati su pokazali na postojanje različite regionalne distribucije 657del5 alela u Poljskoj. S obzirom na njenu veću zastupljenost u slovenskim zemljama, i u Rusiji su sprovedjene analize njenog prisustva. *NBS1* 657del5 mutacija je pronađena samo kod jedne osobe od 302 pacijenta (0,3%) sa karcinomom dojke i porodičnom istorijom bolesti u grupi ispitanika u Rusiji (Sokolenco i sar., 2007). U drugim populacijama su prijavljene druge štetne mutacije u *NBS1* genu (698del4 engleskog porekla, 835del4 italijanskog porekla i Q326X holandskog porekla) ali se još uvek ne zna njihov uticaj na karcinom dojke.

S obzirom da su brojne studije u slovenskim populacijama pokazale prisustvo mutacije 657del5 (sa učestalošću oko 0,5%) kod pacijenata sa karcinomom dojke i porodičnom istorijom bolesti, zanimalo nas je da ispitamo njeno eventualno prisustvo u našoj grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika koja je odabrana iz slovenske populacije na osnovu visokog rizika za oboljevanje. Nismo pronašli 657del5 mutaciju kod 45 ispitanika iz ove grupe što ne ukazuje na njeno odsustvo iz populacije u Srbiji, ali najverovatnije ukazuje na njenu nisku učestalost. Nedostatak naše studije je bila nemogućnost ispitivanja celog kodirajućeg regiona *NBS1* gena u cilju pronalaženja drugih potencijalno specifičnih mutacija. U ovom ispitivanju smo bili ograničeni na detekciju samo najučestalije mutacije u *NBS1* genu. Medjutim, s obzirom na njenu nisku populacionu učestalost čak i u zemljama kod kojih je prijavljena kao osnivačka, ne čudi njeno odsustvo iz naše ispitivane grupe. Bilo bi zanimljivo ispitati i njenu zastupljenost u drugim slovenskim zemljama da bi se utvrdila njena geografska distribucija i ispitalo da li je ona osnivačka samo za poljsku

populaciju. Na žalost, takvi podaci su još uvek nepoznati. Veliko pitanje na koje treba odgovoriti je, koji je globalni uticaj ove mutacije i u zemljama koje su geografski udaljene, kao i koji je uticaj drugih mutacija u ovom genu na rizik za kancer.

Iako imaju nisku učestalost, mutacije u *NBS1* genu sa posebnim akcentom na 657del5, mogu se svrstati u srednje penetrabilne alele za karcinom dojke, sa najvećim značajem za populacije gde je prijavljena kao osnivačka mutacija.

5.6. XRCC1 i KARCINOM DOJKE

Pošto XRCC1 protein ima vodeću ulogu u procesu popravke grešaka u DNK isecanjem baze (BER), polimorfne varijante ovog gena (R194W, R280H i R399Q) se često ispituju u svetlu povećanja rizika za različite karcinome. Njihova lokacija u okviru gena, kao i evolutivna konzerviranost domena za koje su odgovorni, čine ih idealnim kandidatima sa potencijalno značajnim funkcionalnim posledicama.

Interesantna veza promena u *XRCC1* genu sa nastankom karcinoma dojke pokazana je u velikoj američkoj studiji u koju su bili uključeni radiološki tehničari oboleli od karcinoma dojke čiji je glavni faktor rizika bila višegodišnja izloženost malim dozama jonizujućeg zračenja (Sigurdson i sar., 2004). S obzirom da direktna i indirektna oštećenja uzrokovana zračenjem između ostalog uzrokuju nastanak jednolančanih prekida u DNK koji se ispravljaju BER-om, *XRCC1* je ispitivan kao mogući uzročnik nastanka maligniteta. Tada je, između ostalog, pokazana povezanost Arg399Gln polimorfizma sa karcinomom dojke izazvanog jonizujućim zračenjem (OR: 3,4; 95%CI: 1,3-9,3). Ovaj gen je postao atraktivan i kao jedan od srednje penetrabilnih gena u karcinomu dojke nevezanim za spoljašnje zračenje, upravo zbog toga što se njegova zaštitna sposobnost ne odnosi samo na popravke grešaka nastalih na taj način.

5.6.1. *XRCCI* Arg399Gln polimorfizam i rizik za karcinom dojke

Funkcione studije *XRCCI* ukazuju na to da 399Gln alel može biti povezan sa brojnim fenotipovima koji proizilaze iz oštećenja u DNK, i nagoveštavaju da ovaj alel ima potencijalno štetnu ulogu u humanim tkivima (Duell i sar., 2001), kao i da utiče na odgovor na različite antikancerske terapije (Wallace i sar., 2012). Takođe, uočena je značajna razlika u sposobnosti popravke grešaka nastalih jonizujućim zračenjem kod limfocita osoba koje su homozigoti za Arg399Gln, kao i asocijacija ovog polimorfizma sa značajno povećanom učestalošću hromozomskih aberacija kod pušača (Wallace i sar., 2012).

U našem radu smo ispitivali postojanje veze između Arg399Gln polimorfizma *XRCCI* gena i nastanka karcinoma dojke kod visoko rizičnih porodica. Ispitali smo i vezu ovog polimorfizma sa karcinomom dojke koji nije vezan za porodičnu istoriju bolesti, kao i njegovu vezu sa nastankom ranog karcinoma dojke u obe grupe.

Slično kao i ispitivanjem polimorfizama nukleotidne sekvence u drugim genima, i u ovom slučaju su rezultati različitih istraživanja kontradiktorni. Duell i saradnici (2001) su pokazali pozitivnu asocijaciju 399Gln alela sa karcinomom dojke kod žena afroameričkog porekla ali ne i kavkaskog porekla. Shu i saradnici (2003) su prijavili da Arg399Gln polimorfizam ne igra značajnu ulogu u nastanku karcinoma dojke kod Kineskinja, a i Smith i saradnici (2003) takođe nisu pokazali vezu ovog polimorfizma sa karcinomom dojke. Pozitivna asocijacija Gln/Gln genotipa sa karcinomom dojke je utvrđena u populaciji Poljske (OR:2,08; 95%CI: 1,08-3,98) (Romanowicz i sar., 2010). Huang i saradnici (2009) su meta-analizom pokušali da rasvetle ulogu ovog polimorfizma u karcinomu dojke. Na osnovu njihovih rezultata, nosioci Gln alela su imali povećan rizik za oboljevanje. Takođe, u recesivnom modelu (Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg) pokazan je povećan rizik za oboljevanje kod Azijata (OR:1,26; 95%CI: 0,96-1,64), kod Afrikanaca (OR:1,80; 95%CI: 0,97-3,32) i kod Kavkazijanaca (OR:1,08; 95%CI: 0,95-1,22). Ova meta analiza je pokazala da je i u dominantnom, i u recesivnom modelu, Arg399Gln *XRCCI* gena povezan sa povećanim rizikom za karcinom dojke.

U našem ispitivanju je postojala razlika u učestalosti Gln/Gln genotipa kod ispitanika iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika (45,8%) u odnosu kontrolnu grupu

(34,2%), a slično je dobijeno i kod Arg/Gln genotipa (43,8% vs. 31,6%). Dobijeni rezultati su pokazali da su nosioci Gln alela u dominantnoj formi (Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg) u povećanom riziku za oboljevanje od karcinoma dojke u grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika (Tabela 39). Kada smo iz ove grupe odabrali mlađe od 40 godina, dobijeno je povećanje rizika za oboljevanje kod nosilaca Gln alela u recesivnoj formi, ali i kod nosilaca Gln alela u dominantnoj formi (Tabela 39). Dobijene rezultate smo uzeli u detaljnije razmatranje imajući u vidu da genotipske učestalosti u kontrolnoj grupi za ovaj lokus nisu bile u skladu sa očekivanim prema Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži (eng. *Hardy-Weinberg equilibrium*- HWE). Testiranje odstupanja genotipskih učestalosti od očekivanih po HWE (eng. *Departure from HWE* - DHW) se koristi kao svojevrsna kontrola kvaliteta studija asocijacija u pogledu uzorkovanja (Wang i Shete, 2009). DHW u kontrolnoj grupi se najčešće interpretira kao pokazatelj greške u genotipizaciji pa se ovakvi rezultati vrlo često odbacuju bez detaljnijih analiza svih razloga koji do odstupanja mogu dovesti. Može da se desi da odstupanje od HWE predstavlja efekte nastale selekcijom, odnosno postojanjem vezanosti posmatranog plimorfizma za neki lokus pod selekcijom, zatim, efektom asortativnog parenja, malom veličinom ispitivane grupe, stratifikacijom populacije na subpopulacije i slično. Odbacivanje rezultata koji pokazuju DHW, bez analize uzroka odstupanja stoga može propustiti značajne varijante na nastanak i razvoj bolesti (Esser i Tomiuk, 2005).

Prema brojnim radovima koji se bave ovom problematikom, nisu utvrđene jasne granice za definisanje DHW-a i ne zna se šta tačno treba uraditi sa onim markerima koji zadovoljavaju sve druge kriterijume kontrole kvaliteta studije osim HWE (Wittke - Thompson i sar., 2005). U našoj studiji, učestalost genotipova polimorfne varijante *XRCCI* gena, Arg399Gln, značajno je odstupala od one predviđene HWE-om kada smo ispitivali celu kontrolnu grupu. S obzirom da kod druga dva ispitana lokusa (135G>C *RAD51* i Arg72Pro *TP53*) nije došlo do odstupanja u kontrolnoj grupi, prepostavili smo da nije došlo do greške u genotipizaciji. Sličnu situaciju su prijavili i Costa i saradnici (2007), u čijoj je studiji došlo DHW-a jednog od nekoliko ispitivanih genskih lokusa.

Wang i Shete (2009) su došli do zaključka da jedan od uzroka može biti nedovoljno dobro definisanje kontrolne grupe. Ukoliko je bolest česta, može da se desi da kontrole u

stvari ne oslikavaju stvarno stanje u opštoj populaciji jer sami slučajevi već predstavljaju veliki deo populacije. Kada je učestalost bolesti visoka (19 - 36%), ovaj fenomen je još izraženiji.

Da bismo videli kakav uticaj na HWE ima struktura kontrolne grupe, pokušali smo da definišemo novu kontrolnu grupu koju su činile samo osobe koje su bile starije od 60 godina, s obzirom da se kancer u starijim godinama i ispoljava najvećom verovatnoćom. I za *XRCCI* lokus smo uradili dodatno testiranje za HWE. U tom slučaju, učestalosti genotipova za ovaj lokus nisu odstupale od onih predviđenih HWE-om. Ispitali smo i asocijaciju Arg399Gln polimorfizma sa ranim karcinomom dojke koristeći ovu kontrolnu grupu i dobili smo rezultate koji se nisu razlikovali od onih dobijenih korišćenjem cele kontrolne grupe što je potvrdilo značaj Gln alela kod naslednog karcinoma dojke. Ovo nam je ukazalo na to da je najverovatnije struktura same kontrolne grupe na neki način uzrokovala statistički značajno odstupanje od HWE za *XRCCI* lokus.

Što se tiče raspodele genotipova u celoj kontrolnoj grupi, primetno je smanjenje broja heterozigota (Arg/Gln- 31,6%) u odnosu na homozigote (Arg/Arg, Gln/Gln- 34,2%) i to smanjenje heterozigota je u odnosu na očekivane učestalosti prema HWE. Uzrok može biti stratifikacija populacije kada je ovaj lokus u pitanju. Na taj način se ukupna učestalost heterozigota smanjuje u mešanoj populaciji čak iako su postojeće subpopulacije u HWE (Valundov efekat). U našoj ispitivanoj grupi je najverovatnije došlo do narušavanja nekog od preduslova za održanje HW ravnoteže, kao što je na primer postojanje struktuiranosti grupe prema stepenu srodstva ili zajedničke sredine iz koje potiču, što je uzrokovalo pojavu DHW-a.

Iako se HWE test i dalje koristi kao neophodan korak i kontrola kvaliteta u genetičkim studijama asocijacija, ovaj metod je pokazao i svoje nedostatke i ukazao na neophodnost njegovog unapređivanja, da se SNP-ovi značajni za nastanak bolesti ne bi odbacivali. U svakom slučaju, verovatno je bolja varijanta prijaviti marker koji je pokazao značajnost i nastaviti detaljnije ispitivanje razlogaza DHW, nego izgubiti potencijalno značajan molekularni marker.

Tabela 39. Asocijacija Arg399Gln polimorfizma *XRCCI* gena sa karcinomom dojke
 (*rezultati su statistički značajni)

GRUPE	<i>XRCCI</i> Arg399Gln	(OR; 95% CI)
nasledni vs. ceo kontrolni uzorak	Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	(4,47; 1,64-12,2)*
nasledni (≤40 god.) vs. ceo kontrolni uzorak	Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	(3,36; 1,30-8,70)* (10,9; 1,41-84,24)*
nasledni (≤40 god.) vs. ceo kontrolni uzorak >60 god.	Gln/Gln vs. Arg/Gln+Arg/Arg Gln/Gln+Arg/Gln vs. Arg/Arg	(14,4; 1,7-123,7)* (5; 1,47-16,98)*

Naši rezultati ispitivanja veze Arg399Gln polimorfizma *XRCCI* gena sa nastankom karcinoma dojke su pokazali značajnu vezu Gln alela sa povećanjem rizika za oboljevanje i to kod osoba sa porodičnom istorijom bolesti, kao i kod osoba sa ranim karcinomom dojke u istoj grupi. To znači da će osoba koja ima porodičnu istoriju bolesti i nosilac je Gln alela, imati veći rizik za oboljevanje u mladjem životnom dobu nego osoba koja u svom genotipu ima Arg alel ove polimorfne varijante. Ovaj rezultat ukazuje da efekti Arg399Gln polimorfizma na rizik za karcinom dojke variraju u odnosu na prisustvo porodične istorije, što je u skladu sa rezultatima u drugim populacijama. Tako su Smith i saradnici (2003) posebno ispitivali uzorke zdravih osoba koje su imali pozitivnu porodičnu istoriju karcinoma dojke, i pokazali su da ovi ispitanici imaju vrlo sličnu genotipsku distribuciju kao i osobe obolele od karcinoma dojke, što je potvrdilo hipotezu da ovaj SNP zaista doprinosi riziku za karcinom dojke kod osoba sa porodičnom istorijom bolesti. Slično su kasnije potvrdili i Figueiredo i saradnici (2004). Moguće objašnjenje prisustva asocijacije sa porodičnom istorijom bolesti može biti to da se porodična istorija, naročito u prvostepenom srodstvu, odnosi zajedničke gene i sredinu koje članovi porodice dele. U tom slučaju će prisustvo i efekat pojedinačnog polimorfizma biti značajni samo u prisustvu ovih, zajedničkih faktora koji ga podržavaju. Medju pojedincima bez porodične istorije, ovaj efekat može biti prikriven delovanjem drugih, neidentifikovanih genetičkih faktora i faktora sredine.

Pronalazak veze 399Gln alela sa višim nivoom DNK adukata, somatskih mutacija, razmene izmedju sestrinskih hromatida i hromozomskih oštećenja (Duell i sar., 2000; Lei i

sar., 2002; Relton i sar., 2002), ukazuje na značajnu vezu ovog alela sa narušenom sposobnošću popravke grešaka u DNK, što sa druge strane podržava naše rezultate vezane za rizik za karcinom dojke kod nosilaca Gln alela.

5.6.2. Povezanost Arg399Gln polimorfizma *XRCC1* gena sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora

Kao i u slučaju drugih SNP-ova, podataka o povezanosti *XRCC1* Arg399Gln polimorfizma sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama tumora ima jako malo. Čak i oni koji su se bavili tematikom, nisu pronašli značajniju vezu (Rodrigues i sar., 2011). Mi smo, pored ispitivanja uticaja Arg399Gln polimorfizma na rizik za nastanak karcinoma dojke, ispitivali i postojanje njegove asocijacije sa karakteristikama tumora i karakteristikama domaćina tumora, kao i doprinos ovog polimorfizma prognozi bolesti u sistematskom uzorku karcinoma dojke. Nismo ustanovili razlike u distribuciji genotipova ovog polimorfizma u odnosu na starost u vreme dijagnoze i u odnosu na status menopauze.

Nismo primetili veću učestalost nekog od genotipova kod pacijentkinja kod kojih je karcinom bio veći od 2 cm (T2+T3) u odnosu na T1 status tumora (≤ 2 cm). Međutim, ispitivanjem razlika u distribuciji polimorfničkih varijanti kod dva najučestalija histološka tipa karcinoma, invazivnog duktalnog i invazivnog lobularnog, dobili smo statistički značajnu razliku u učestalosti Gln/Gln+ArgGln genotipova u odnosu na Arg/Arg genotip ($\chi^2=4,29$; OR=2,92; 95%CI=1,03-8,28). Ovaj rezultat je ukazao na pozitivnu asocijaciju *XRCC1* Arg399Gln polimorfizma sa invazivnim lobularnim karcinomom dojke u grupi ispitivanih pacijenata. Nismo pronašli statistički značajne razlike u distribuciji genotipova ovog polimorfizma kod drugih parametara tumora: status steroidnih receptora, Her2 status, N status i histološki gradus tumora.

I u ovom slučaju će definitivni zaključak uticaja *XRCC1* polimorfizma na ishod karcinoma dojke zavisiti od dugoročnog praćenja toka bolesti pacijenata i njihovog ukupnog preživljavanja.

5.7. POLIMORFIZMI *TP53*, *RAD51* i *XRCC1* GENA KAO PROGNOŠTIČKI MARKERI KARCINOMA DOJKE

Do pre jedne decenije, karcinom dojke je sa terapijske strane posmatran relativno uniformno, sa fokusom isključivo na određivanju da li je tumor zavisn ili nezavisn od estrogena. Otkrićem novih tehnologija analize ekspresionih profila setova gena, karcinom dojke se danas karakteriše i na osnovu svoje molekularne heterogenosti. Otkriće molekularnih podtipova karcinoma dojke omogućilo je razvoj novih terapijskih strategija koje su bolje odgovarale biologiji karcinoma nego što je to bio slučaj ranije (Boyle, 2012).

I pored otkrića 5 podtipova karcinoma dojke (Luminalni A, Luminalni B, Her2 tip, podtip sličan bazalnom karcinomu i podtip koji liči na normalno tkivo dojke), karcinom dojke koji se i dalje izdvaja i ispituje kao entitet sa najlošijim prognostičkim karakteristikama je *triple-negative* karcinom dojke (TNBC), koga karakterišu odsustvo ekspresije receptora za estrogen (ER), progesteron (PR) i Her2. Analiza ekspresionih profila karcinoma dojke kategorizovala je 71% - 91% TNBC kao podtip tumora sličan bazalnom karcinomu (eng. *basal-like*) (Anderson i sar., 2014). Nasuprot tome, do 20% *basal-like* karcinoma nema TNBC fenotip, i može u određenoj meri ekspimirati ER i Her2. Stoga termini *basal-like* i TNBC opisuju entitete koji se preklapaju ali nisu sinonimni.

TNBC čini 15%-20% od svih invazivnih karcinoma dojke i povezan je sa pojavom bolesti u mladjem životnom dobu, čestim prisustvom porodične istorije bolesti, mutacijama u *BRCA1* genu, i češći je kod žena afro-američkog porekla (Boyle, 2012; Suba, 2014). Posmatrano sa kliničke strane, TNBC karcinomi pokazuju agresivniji fenotip i brzu progresiju bolesti sa prisustvom velikog broja ranih metastaza, veći rizik sistemskog relapsa i povećanu smrtnost u odnosu na druge tipove (Clark i sar., 2014). Relaps se kod ovog tipa tumora javlja između prve i treće godine nakon dijagnoze, a smrtnost je najčešća nakon 5 godina od primene terapije.

Pristup lečenju hormon senzitivnih karcinoma dojke se zasniva na endokrinoj terapiji i upotrebi anti-estrogenih lekova (tamoksifen, raloksifen, inhibitori aromataze). S obzirom na biološke karakteristike tumora, TNBC ne može biti tretiran endokrinom

terapijom ili biološki ciljanim terapijama, pa kao jedina opcija ostaje citotoksična hemioterapija. Prisustvo Her2 proteina u karcinomima dojke je samo po sebi negativan prognostički faktor, ali i retrospektivne kliničke studije ukazuju na činjenicu da pacijenti sa ER+ tumorima imaju manju korist od adjuvantne terapije tamoksifenom ako su njihovi karcinomi Her2+ nego u slučaju da su oni Her2- (Yamauchi i sar., 2001). Nasuprot tome, nedostatak ER je nedvosmisleno jasan indikator loše prognoze karcinoma dojke.

S obzirom na kompleksnost terapijskog pristupa u lečenju TNBC, izuzetno je važno ispitati njegovu genetičku osnovu u cilju pronalaženja novih molekularnih markera koji bi efikasno predvideli tok bolesti i odgovor na terapiju. U ovom radu smo ispitivali ulogu polimorfničkih varijanti *TP53*, *RAD51* i *XRCC1* gena kao potencijalnih prognostičkih biomarkera u TNBC. Posmatrali smo zastupljenost ovih polimorfničkih varijanti kod TNBC grupe kao prognostički najnepovoljnije, u odnosu na grupu koja je posedovala terapijski najpovoljnije karakteristike (ER+, PR+, Her2- grupa). Takodje smo poredili zastupljenost i distribuciju ovih polimorfničkih varijanti kod TNBC grupe u odnosu na preostale pacijentkinje koje nisu imale TNBC fenotip ali nisu dalje karakterisane u odnosu na ER, PR i Her2 status. Za razliku od Arg72Pro varijante u *TP53* i Arg399Gln varijante u *XRCC1* genu, genotipovi polimorfne varijante 135G>C *RAD51* gena su pokazali značajne razlike u distribuciji izmedju ispitivanih grupa. Kada smo uporedili TNBC grupu sa pacijentkinjama čije su karakteristike tumora bile povoljnije (ER+PR+Her2- grupa), C alel u dominantnoj formi (C/C+G/C) je bio značajno učestaliji u TNBC grupi. To nam ukazuje na činjenicu da će nosioci C alela češće imati agresivnu formu bolesti (TNBC) u odnosu na nosioce G alela. Isto smo potvrdili i kada smo TNBC grupu uporedili sa preostalim pacijentkinjama koje nisu imale TNBC fenotip ali dalje nisu karakterisane u odnosu na ER, PR i Her2 status (Tabela 40). Ovi rezultati su nam ukazali na potencijalni značaj *RAD51* polimorfne varijante kao biološkog markera koji bi ukazao na prognostički agresivan fenotip karcinoma dojke koga karakteriše nedostatak receptora za estrogen, progesteron i Her2. Ovaj rezultat je dodatno dopunio prethodni koji smo otkrili, a tiče se povezanosti *RAD51* polimorfizma sa ER- karcinomima.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da će, ukoliko obole od karcinoma dojke, nosioci C alela *RAD51* polimorfne varijante 135G>C, češće imati agresivan oblik

bolesti (TNBC). Pošto TNBC karcinomi predstavljaju izazov sa stanovišta lečenja jer nijedna ciljana terapija na njih nema efekat, postavlja se pitanje da li određeni genotip ove polimorfne varijante može da se poveže sa kliničkim odgovorom na terapiju. Da bi se dobio odgovor na ovo pitanje, odnosno da bismo mogli da tvrdimo da će nosioci nekog od genotipova polimorfne varijante 135G>C imati bolji odgovor na terapiju, neophodno je dugoročno praćenje kliničkog toka bolesti.

Tabela 40. Rezultat ispitivanja asocijacije *RAD51* 135G>C sa TNBC karcinomom (*rezultati su statistički značajni)

polimorfizam (OR;95%CI)	TNBC grupa vs. ER+PR+Her2- grupa	TNBC grupa vs. preostale pacijentkinje
	<i>RAD51</i> 135G>C	C vs. G (8,0; 2,14-29,93)* C/C+G/C vs. G/G (7,5; 1,61-34,95)*

5.8. NEDOSTAJUĆA HERITABILNOST

Velike genomske studije asocijacija (GWAS) kojima je analizirano skoro million SNP-ova kod više hiljada ispitanika, predstavljaju novo moćno oružje za ispitivanje genetičke osnove kompleksnih bolesti uključujući i kancer. Ove studije su uspele da opravdaju velika očekivanja koja su postojala, i uz pomoć njih je otkriveno stotine genskih varijanti povezanih sa različitim oboljenjima koje, iako imaju mali pojedinačni efekat, ipak nedvosmisleno pokazuju da su statistički značajno povezane sa rizikom za nastanak bolesti. Međutim, danas je jasno da čak i ogroman broj novootkrivenih alelskih varijanti ne može da objasni kompletnu naslednu predispoziciju (Foulkes i Tomlinson, 2010). Sve učestale varijante, pojedinačno ili zajedno, ipak doprinose relativno malom povećanju rizika i objašnjavaju samo jedan deo heritabilnosti koja predstavlja deo fenotipske varijanse koja se može pripisati genotipskoj (Manolio i sar., 2009). Pa i kada govorimo o karcinomu dojke, bez obzira na značajan efekat genskih varijanti na povećanje rizika, svi do sada otkriveni geni opisuju ukupno samo oko 30% heritabilnosti.

Odmah je postavljeno sledeće pitanje: šta se desilo sa ostatkom heritabilnosti? Odnosno, na koji način se može objasniti ostatak nasledne predispozicije? Odgovori na ovo pitanje najverovatnije leže upravo u nedostacima GWAS studija, odnosno fenomenima kojima one još uvek nisu pristupile.

Naime, glavna karakteristika GWAS studija je to da se one baziraju na pretpostavci da u osnovi čestih oboljenja leže česte alelske varijante, i bave se samo njihovim ispitivanjem (hipoteza “često oboljenje - česta varijanta”) (Manolio i sar., 2009). Komercijalni SNP čipovi su olakšali ova ispitivanja i pokrili skoro sve učestale varijante u genomu. Međutim, GWAS studije nisu pristupile problemu pronalaska retkih varijanti koje imaju značajniji efekat na nastanak bolesti, i koje predstavljaju jednog od glavnih kandidata za popunjavanje “crne rupe” heritabilnosti (eng. *dark matter*) (Foulkes i Tomlinson, 2010). Strategije za njihovu detekciju u velikim populacionim studijama još uvek ne postoje. Problem je to da one nisu dovoljno učestale da bi se detektovale GWAS-om, a u isto vreme nemaju dovoljno veliki efekat na razvoj bolesti da bi se mogle detektovati klasičnim studijama vezanosti (eng. *linkage analysis*) (Manolio i sar., 2009). Glavni pristup njihovom pronalaženju biće sekvenciranje regiona od interesa ili čak celih genoma. Velike nade se polažu u tehnologije sekvenciranja nove generacije (eng. *Next generation sequencing* - NGS), koje obradjuju milione sekvenci paralelno i koje će pomoći u rešavanju ovog problema. Da bi se lakše otkrili retki aleli sa većim uticajem na razvoj bolesti izuzetno je važno prepoznati pojedince ili porodice sa karakterističnim fenotipom koji su najverovatnije nosioci takvih varijanti. Kod ovakvih porodica je lakše pronaći retke alele nego kod velikog broja neodabranih jedinki. Upravo je to slučaj sa sindromom naslednog karcinoma dojke i jajnika gde je izuzetno bitno prepoznati porodice sa nakupljanjem obolelih, i utvrditi potencijalno prisustvo retkih varijanti koje bi doprinele povećanju rizika za oboljevanje. Danas se veruje se da će prethodno postavljena hipoteza “česta bolest - česta varijanta” biti odbačena i zamenjena ispitivanjem novog modela: “česta bolest - retka varijanta” koji će možda moći da objasni nedostatak heritabilnosti (Dickson i sar., 2010).

Drugo objašnjenje postojanja nedostatka heritabilnosti odnosi se na strukturne varijacije koje uključuju promene u broju kopija regiona genoma (eng. *Copy number variants* - CNVs). Iako postoje napori da se u GWAS uključe i analize CNV-ova, rano je

govoriti o tome jer se strategije za njihovu detekciju još uvek razvijaju i imaju brojna ograničenja. Veliki napredak u detekciji CNV-ova se očekuje unapređivanjem algoritama za njihovu analizu i uvođenjem velikih studija sekvenciranja (Manolio i sar., 2009).

Možda razlog postojanja neobjašnjenog dela genetičke osnove karcinoma dojke leži i u činjenici da naučnici svu svoju pažnju fokusiraju na pronalazak novih varijanti, pre nego na ispitivanje međusobnih interakcija poznatih faktora. U skladu ovim, Antoniou i Trench (2010) su pretpostavili da nisko penetrabilni aleli pronadjeni u GWAS mogu biti značajni, ali u svetlu njihove sposobnosti da modifikuju penetrabilnost retkih alela sa većim uticajem na bolest, pa i na taj način mogu objasniti deo heritabilnosti. Pored nabrojanih faktora, i izloženost faktorima rizika u spoljašnjoj sredini može značajno da doprinese naslednoj predispoziciji, pa u zavisnosti od toga, osoba sa velikim genetičkim rizikom za oboljevanje ne mora da oboli, dok osoba sa malim genetičkim rizikom može da oboli usled delovanja faktora rizika iz spoljašnje sredine (Galvan i sar., 2010). Stoga, ne smemo da odbacimo ni značaj ovih faktora koji GWAS studijama takodje nisu ispitivani.

Veliki broj dostupnih podataka ukazuje na to da sa sigurnošću možemo odbaciti scenario koji se odnosi na postojanje jedne ili nekoliko varijanti koje samostalno mogu objasniti rizik za oboljevanje. Bez obzira na njihovu učestalost i tip najverovatnije je da stotine, pa čak i hiljade, genetičkih varijanti učestvuju u riziku za nastanak karcinoma dojke.

Još jedan od nedostataka GWAS studija koji treba naglasiti jeste i to da su one sprovedjene u najvećoj meri u evropskim populacijama (Haiman i Stram, 2010). Razlozi za to su delom stvar pogodnosti a delom stvar izbora. Naime, pretpostavlja se da je preduslov za studije koje će dati pouzdane rezultate bez lažno pozitivnih asocijacija, upravo homogenost populacije po poreklu. Kod mešanih populacija, problem bi mogle da predstavljaju različite učestalosti alela, kao i modifikatorski uticaj genetičkih i faktora spoljašnje sredine koji bi mogli da „pojačaju” efekat određene varijante kod jedne grupe ispitanika u odnosu na drugu. Stoga su iz brojnih GWAS studija ispitivanja kancera izbačeni uzorci ispitanika koji su imali drugačije poreklo od većine, a ta većina je upravo predstavljala evropske populacije. Da bi se ovaj problem prevazišao, trenutno se radi na

tehnološkim i statističkim tehnikama koje bi omogućile združivanje podataka dobijenih iz populacija različitog porekla.

Dakle, bez obzira na ogroman napor koji se ulaže, oko 70% nasledne osnove karcinoma dojke, kao i većine složenih oboljenja je još uvek nepoznanica. Bez obzira na sva ograničenja, GWAS studije će i dalje ostati efikasan alat za ispitivanje ostatka heritabilnosti u karcinomu dojke. Ceo proces će olakšati sekvenciranje nove generacije i analiza egzoma u karcinomu dojke (~30Mb u okviru protein kodirajućih egzona) kod pacijenata sa izraženom porodičnom istorijom a bez mutacija u visoko penetrabilnim genima. Neophodno je i unaprediti metode za detekciju strukturnih varijacija, obezbediti alate koji će analizirati uticaj faktora spoljašnje sredine na rizik za nastanak bolesti, i uključiti rezultate dobijene ispitivanjima ne-evropskih populacija.

Krajnji cilj svih ovih istraživanja je definisanje kompletne genetičke osnove karcinoma dojke da bismo efikasnije pristupili merama redukcije rizika, prevencije, uspostavljanja rane dijagnoze i adekvatnog lečenja. Ukoliko bi se pokazalo da poznate genetičke varijante značajno doprinose nastanku bolesti i efikasnijem lečenju, verovatno bismo sa manjom grižom savesti ostavili deo heritabilnosti neobjašnjen. Veći problem će nastati ukoliko se pokaže da je genetička heterogenost u karcinomu dojke ogromna, i da će svaki oboleli ispoljavati svoju „privatnu epidemiologiju“ (Galvan i sar., 2010). Danas su kriterijumi za testiranje prisustva mutacija u *BRCA1* i *BRCA2* genima jasno definisani, i skrining mutacija u ovim genima kod osoba sa izraženom porodičnom istorijom omogućava određivanje individualnog rizika za razvoj karcinoma dojke. Identifikacija dodatnih genetičkih varijanti mogla bi da utiče na rizik za oboljevanje, prognozu i lečenje, što bi omogućilo razvoj dijagnostičkih strategija i strategija za smanjenje rizika koje su individualizovane i efikasne kod nosilaca takvih varijanti. Bez obzira na činjenicu da je otkriven veliki broj gena uključen u razvoj karcinoma dojke, i dalje je neizvesno da li će i kada oni biti uvedeni u rutinsko kliničko testiranje jer procena rizika kod nosilaca različitih varijanti u njima još uvek nije jasna. S obzirom da je rizik za razvoj bolesti kod nosilaca ovih varijanti još uvek nepoznat, ne može se doneti ni jasna klinička odluka na osnovu njihovog prisustva ili odsustva. Genetičko testiranje bi u tom slučaju samo doprinelo nesigurnosti u interpretaciji rezultata zbog nedovoljne količine dostupnih podataka, pa bi

moglo da doprinese nepotrebnim intervencijama kod nosilaca određenih varijanti, ili lažnog osećaja sigurnosti kod onih koji te varijante nemaju.

U zaključku, na osnovu trenutnih saznanja, ne postoje jasni dokazi koji bi opravdali uvođenje skrininga srednje i nisko penetrabilnih alela za karcinom dojke u kliničku rutinu. U bliskoj budućnosti ipak, sa novim generacijama visokopropusnih tehnologija sekvenciranja i moćnim alatima za procenu rizika (porodična istorija, način života i dostupna genetička informacija), individualna procena rizika će omogućiti primenu adekvatnih preventivnih mera. One će biti intenzivirane kod osoba sa povišenim rizikom, a smanjene kod onih sa nižim rizikom za oboljevanje. Jednom kada se validiraju, ovi alati će omogućiti dostizanje nivoa gde će se preklapati statistička i klinička značajnost, pa će i skrining programi bazirani na genetičkoj informaciji voditi smanjenju smrtnosti od karcinoma dojke. Uspešna upotreba genetičkih profila panela gena za karcinom dojke imaće dobrobit u kliničkoj praksi u smislu ranije dijagnoze, smanjenja troškova lečenja, uvođenja manje agresivnih terapijskih intervencija i praćenja toka bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Najvažniji dobijeni rezultati ovog rada su:

- U grupi ispitanika sa pozitivnom porodičnom istorijom za karcinom dojke i/ili jajnika kod kojih je sekvenciranje celih *BRCA1* i *BRCA2* gena dalo negativan rezultat, nisu nadjeni veliki genski rearanžmani u oba gena.
- U grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika nisu pronadjene štetne mutacije: 1100delC u *CHEK2* genu i 657del5 u *NBS1* genu.
- Pronadjena je velika delecija 9. i 10. egzona *CHEK2* gena (Del5395) kod jedne pacijentkinje iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika.
- Analizom celog kodirajućeg regiona *RAD51C* gena u grupi naslednog karcinoma dojke/jajnika pronadjeno je ukupno 5 promena uključujući 2 *missense*, jednu

intronsku, jednu varijantu u 5'UTR regionu i jednu u promotorskom regionu gena. Nijedna od njih nije bila jasno oštećujuća mutacija.

- Kod 21 osobe iz grupe naslednog karcinoma dojke/jajnika obolele od ranog karcinoma dojke (≤ 40 godina) nisu pronadjene mutacije u 8. egzonu *TP53* gena.
- Iako je učestalost Pro alela 72. kodona *TP53* gena u naslednom, sistematskom i kontrolnom uzorku bila slična, vrednosti OR ukazuju da nosioci Pro alela imaju povišen rizik za oboljevanje od naslednog karcinoma dojke, dok se Arg alel povezuje sa rizikom za oboljevanje od karcinoma dojke nezavisnog od porodične istorije bolesti.
- Učestalost C/C genotipa 5'UTR regiona *RAD51* gena je bila veća u grupi naslednog karcinoma dojke (8,30%) u odnosu na kontrolnu grupu (0,90%). Vrednosti OR ukazuju na značajno povišenje rizika za oboljevanje od naslednog karcinoma dojke, kao i ranog karcinoma dojke, kod nosilaca C alela u homozigotnoj formi.
- 135C alel *RAD51* gena je značajno zastupljeniji u karcinomima dojke koji su negativni za estrogene receptore, kao i kod ER-PR-Her2- karcinoma dojke (*triple-negative* karcinom dojke)
- Učestalost Gln/Gln genotipa *XRCCI* gena je bila veća u grupi naslednog karcinoma dojke (45,8%) u odnosu na kontrolnu grupu (34,2%). Vrednosti OR ukazuju na značajno povišenje rizika za oboljevanje od naslednog karcinoma dojke, kao i ranog karcinoma dojke kod nosilaca Gln alela, i u homozigotnom, i u heterozigotnom stanju.
- Pokazana je pozitivna asocijacija *XRCCI* Arg399Gln polimorfizma sa invazivnim lobularnim karcinomom dojke.

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Nedostatak velikih genskih rearanžmana u *BRC1/2* genima, kao i štetnih mutacija u *TP53*, *RAD51C* i *NBS1* genima, ukazuje na potrebu analize prisustva mutacija u drugim srednje penetrabilnim genima povezanim sa karcinomom

dojke (*BRIP1*, *PALB2*, *ATM*, *ATR*, *RAD50*) koji bi eventualno objasnili naslednu predispoziciju u grupi visoko rizičnih ispitanika. Takođe, u visoko rizičnim porodicama verovatno postoje i dodatne, još uvek neidentifikovane genske varijante koje doprinose povećanju rizika za oboljevanje.

- Pronalazak *CHEK2* Del5395 mutacije ne dozvoljava odbacivanje ovog gena kao potencijalno značajnog u naslednom karcinomu dojke u našoj populaciji, što ohrabruje dodatna ispitivanja potencijalnog osnivačkog karaktera ove mutacije u Srbiji.
- Rezultati vezani za polimorfne varijante *RAD51* i *XRCC1* gena ukazuju na njihovu značajnu vezu sa nastankom karcinoma dojke u Srbiji. Posebno naglašavamo njihov značaj u naslednoj formi bolesti.
- Polimorfna varijanta *RAD51* gena (135G>C) je pokazala povezanost sa prognostički najnepovoljnijom grupom karcinoma dojke (TNBC). Da bi se značaj ove polimorfne varijante pokazao i u smislu predviđanja odgovora na terapiju, neophodne su detaljne studije praćenja toka bolesti koje bi mogle dovesti do zaključka da li *RAD51* 135G>C može doprineti boljem profilisanju ove prognostičke grupe karcinoma dojke.
- Obzirom da svi do sada ispitivani geni u karcinomu dojke malim udelom doprinose nastanku nasledne predispozicije, dobijeni rezultati ukazuju na kompleksnost definisanja poligenog modela naslednog karcinoma dojke.

7. LITERATURA

- Adank MA, Jonker MA, Kluijdt I, van Mil SE, Oldenburg RA, Mooi WJ et al. CHEK2*1100delC homozygosity is associated with a high breast cancer risk in women. *J Med Genet* 2011;48(12):860-3.
- Agata S, Viel A, Della Puppa L, Cortesi L, Fersini G, Callegaro M et al. Prevalence of BRCA1 genomic rearrangements in a large cohort of Italian breast and breast/ovarian cancer families without detectable BRCA1 and BRCA2 point mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(9):791-7.
- Akbari MR, Tonin P, Foulkes WD, Ghadirian P, Tischkowitz M, Narod SA. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res* 2010;12(4):404.
- Al-Qasem A, Toulimat M, Tulbah A, Elkum N, Al-Tweigeri T, Aboussekhra A. The p53 codon 72 polymorphism is associated with risk and early onset of breast cancer among Saudi women. *Oncol Lett* 2012;3(4):875-878.
- Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; [Epub ahead of print]
- Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* 2007;7(12):925-36.
- Antoniou AC, Chenevix-Trench G. Common genetic variants and cancer risk in Mendelian cancer syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(3):299-307.
- Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int.* 2013;2013:747318.
- Assenmacher N, Hopfner KP. MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 2004;113(4):157-66.
- Badie S, Liao C, Thanasoula M, Barber P, Hill MA, Tarsounas M. RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *J Cell Biol* 2009; 185(4):587-600.
- Bai L, Zhu WG p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. MedUnion Press 2006; 141-153.
- Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 2003;3(5):421-9.
- Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002;3(5):370-9.
- Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286(5449):2528-31.

- Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* 2012; Suppl 6:7-12.
- Cao AY, Jin W, Shi PC, Di GH, Shen ZZ, Shao ZM. Identification and characterization of two novel germ line p53 mutations in the non-LFS/non-LFL breast cancer families in Chinese population. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(2):295-303.
- Carreira A, Hilario J, Amitani I, Baskin RJ, Shivji MK, Venkitaraman AR, Kowalczykowski SC. The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell* 2009;136(6):1032-43.
- CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium. CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet* 2004;74(6):1175-82.
- Clague J, Wilhoite G, Adamson A, Bailis A, Weitzel JN, Neuhausen SL. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer cases from high-risk families. *PLoS One* 2011;6(9):e25632.
- Clark O, Botrel TE, Paladini L, Ferreira MB. Targeted therapy in triple negative metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Core Evid* 2014;9:1-11.
- Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 1991; 48(2): 232–242.
- Collins A, Politopoulos I. The genetics of breast cancer: risk factors for disease. *The Application of Clinical Genetics* 2011;4:11–19.
- Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:32.
- Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103(2):209-17.
- Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol* 2009; 33(5):315-8.
- Cybulski C, Górski B, Debniak T, Gliniewicz B, Mierzejewski M, Masojć B et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 2004;64(4):1215-9.
- Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004;75(6):1131-5.

- Cybulski C, Wokołorczyk D, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Górski B et al. A deletion in CHEK2 of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102(1):119-22.
- Cybulski C, Wokołorczyk D, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Górski B et al. A large germline deletion in the Chek2 kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer. *J Med Genet* 2006;43(11):863-6.
- Damin AP, Frazzon AP, Damin DC, Roehle A, Hermes V, Zettler C, Alexandre CO. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 2006;30(6):523-9.
- de Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E et al. p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(7):641-3.
- de la Hoya M, Gutiérrez-Enríquez S, Velasco E, Osorio A, Sanchez de Abajo A, Vega A et al. Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem* 2006;52(8):1480-5.
- Demuth I, Digweed M. The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene* 2007; 26(56):7792-8.
- den Hollander P, Savage MI, Brown PH. Targeted therapy for breast cancer prevention. *Front Oncol* 2013;3:250.
- di Masi A, Antoccia A. NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk. *Curr Genomics* 2008; 9(4): 275–281.
- Dickson SP, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein DB. Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol* 2010; 8(1):e1000294.
- Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, Winkel S, Lunn RM, Tse CK et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(3):217-22.
- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000;21(5):965-71.
- Dumon-Jones V, Frappart PO, Tong WM, Sajithlal G, Hulla W, Schmid G. Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res* 2003;63(21):7263-9.
- Esser C, Tomiuk J. Reporting Hardy-Weinberg tests in case-control studies: Reasons for caution but not for panic reaction. *The Journal of Investigative Dermatology* 2005;124:1082-1083.

- Figueiredo JC, Knight JA, Briollais L, Andrulis IL, Ozcelik H. Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(4):583-91.
- Filipović S, Stanojević Z, Vrbić S, Pejčić I. Karcinom dojke. In: Filipović S, editor. *Osnovi kliničke onkologije*. Niš: Medicinski fakultet 2009; p. 163-187.
- Foulkes WD, Tomlinson IP. Are we there yet? Journeying along the cancer genetic information superhighway. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(3):197-200.
- French CA, Tambini CE, Thacker J. Identification of functional domains in the RAD51L2 (RAD51C) protein and its requirement for gene conversion. *J Biol Chem* 2003; 278(46):45445-50.
- Gad S, Caux-Moncoutier V, Pagès-Berhouet S, Gauthier-Villars M, Coupier I, Pujol P et al. Significant contribution of large BRCA1 gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families. *Oncogene* 2002;21(44):6841-7.
- Galvan A, Ioannidis JP, Dragani TA. Beyond genome-wide association studies: genetic heterogeneity and individual predisposition to cancer. *Trends Genet* 2010; 26(3):132-41.
- Gao LB, Pan XM, Li LJ, Liang WB, Zhu Y, Zhang LS, Wei YG, Tang M, Zhang L. RAD51 135G/C polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis from 21 studies. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125(3):827-35.
- Garcia-Casado Z, Romero I, Fernandez-Serra A, Rubio L, Llopis F, Garcia A et al. A de novo complete BRCA1 gene deletion identified in a Spanish woman with early bilateral breast cancer. *BMC Med Genet* 2011;12:134.
- Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4(2):70-6.
- George P. P53 How crucial is its role in cancer? *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 2011;3(2):19-25.
- Ginsburg OM, Akbari MR, Aziz Z, Young R, Lynch H, Ghadirian P et al. The prevalence of germ-line TP53 mutations in women diagnosed with breast cancer before age 30. *Fam Cancer* 2009;8(4):563-7.
- Górski B, Debniak T, Masojć B, Mierzejewski M, Medrek K, Cybulski C et al. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 106(3):379-81.
- Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res* 2001;61(10):4092-7.
- Gutiérrez-Enríquez S, Balmaña J, Baiget M, Díez O. Detection of the CHEK2 1100delC mutation by MLPA BRCA1/2 analysis: a worthwhile strategy for its

clinical applicability in 1100delC low-frequency populations? *Breast Cancer Res Treat* 2008;107(3):455-7.

- Haiman CA, Stram DO. Exploring genetic susceptibility to cancer in diverse populations. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(3):330-5.
- Hansen Tv, Jønson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlersen B, Nielsen FC. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(2):315-23.
- Harris TJ, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(5):251-65.
- Hartmann C, John AL, Klaes R, Hofmann W, Bielen R, Koehler R et al. Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Hum Mutat* 2004;24(6):534.
- Hasselbach L, Haase S, Fischer D, Kolberg HC, Stürzbecher HW. Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005;26(6):589-98.
- Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res* 2003;63(7):1449-53.
- Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, Schutte M. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20(3):268-76.
- Holt JT, Toole WP, Patel VR, Hwang HY, Brown ET. Restoration of CAPAN-1 cells with functional BRCA2 provides insight into the DNA repair activity of individuals who are heterozygous for BRCA2 mutations. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 186(2): 85–94.
- Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(7):1810-8.
- Huang Y, Li L, Yu L. XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2009; 24(4):331-339.
- Huang Y, Li L, Yu L. XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2009;24(4):331-9.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;162(10):925-42.

- Huzarski T, Cybulski C, Jakubowska A, Byrski T, Gronwald J, Domagała P et al. Clinical characteristics of breast cancer in patients with an NBS1 mutation. *Breast Cancer Research and Treatment* 2013;141(3): 471-476.
- Jakubowska A, Narod SA, Goldgar DE, Mierzejewski M, Masojć B, Nej K, Huzarska J et al. Breast cancer risk reduction associated with the RAD51 polymorphism among carriers of the BRCA1 5382insC mutation in Poland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(5):457-9.
- Jara L, Acevedo ML, Blanco R, Castro VG, Bravo T, Gómez F et al. RAD51 135G>C polymorphism and risk of familial breast cancer in a South American population. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;178(1):65-9.
- Jekimovs CR, Chen X, Arnold J, Gatei M, Richard DJ, Spurdle AB et al. Low frequency of CHEK2 1100delC allele in Australian multiple-case breast cancer families: functional analysis in heterozygous individuals. *Br J Cancer* 2005;92(4):784-90.
- Kanka C, Brozek I, Skalska B, Siemiatkowska A, Limon J. Germline NBS1 mutations in families with aggregation of Breast and/or ovarian cancer from north-east Poland. *Anticancer Res* 2007;27(4C):3015-8.
- Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Monaco R, Abarzua P, Fine RL. Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem* 1999;274(49):34924-31.
- Kleibl Z, Novotny J, Bezdicikova D, Malik R, Kleiblova P, Foretova L et al. The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Res Treat* 2005;90(2):165-7.
- Konecny M, Zavodna K, Vranova V, Vizvaryova M, Weismanova E, Mlkva I et al. Identification of rare complete BRCA1 gene deletion using a combination of SNP haplotype analysis, MLPA and array-CGH techniques. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109(3):581-3.
- Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* 2012;40(13):5795-818.
- Krupa R, Synowiec E, Pawlowska E, Morawiec Z, Sobczuk A, Zadrozny et al. Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2009; 87(1):32-5.
- Lahti-Domenici J, Rapakko K, Pääkkönen K, Allinen M, Nevanlinna H, Kujala M, Huusko P, Winqvist R. Exclusion of large deletions and other rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in Finnish breast and ovarian cancer families. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;129(2):120-3.
- Lai H, Lin L, Nadji M, Lai S, Trapido E, Meng L. Mutations in the p53 tumor suppressor gene and early onset breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2002;1(1):31-6.

- Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, Easton DF. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 2002;20(9):2310-8.
- Laloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet* 2012; 82:105-114.
- Lei YC, Hwang SJ, Chang CC, Kuo HW, Luo JC, Chang MJ, Cheng TJ. Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat Res* 2002;519(1-2):93-101.
- Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, Dagan E, Paperna T, Kasinetz L et al. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(6):3232-6.
- Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families. *Fam Cancer* 2012;11(3):381-5.
- Mangia A, Malfettone A, Simone G, Darvishian F. Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. *Ann Oncol* 2011;22 Suppl 1:i24-30.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009; 461(7265):747-53.
- Margolin S, Eiberg H, Lindblom A, Bisgaard ML. CHEK2 1100delC is prevalent in Swedish early onset familial breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:163.
- Maser RS, Zinkel R, Petrini JH. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 2001;27(4):417-21.
- Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* 2010; 4(3):174-91.
- Mazoyer S. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 2005;25(5):415-22.
- Medjunarodna unija za borbu protiv raka. TNM klasifikacija malignih tumora. 2002;131-141.
- Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 2002;31(1):55-9.
- Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK. Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(19): 323–30.

- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2010;42(5):410-4.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266(5182):66-71.
- Moisan AM, Fortin J, Dumont M, Samson C, Bessette P, Chiquette J et al. No Evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. *Genet Test* 2006;10(2):104-15.
- Mouchawar J, Korch C, Byers T, Pitts TM, Li E, McCredie MR et al. Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Res* 2010;70(12):4795-800.
- Muranen TA, Greco D, Fagerholm R, Kilpivaara O, Kämpjärvi K, Aittomäki K et al. Breast tumors from CHEK2 1100delC-mutation carriers: genomic landscape and clinical implications. *Breast Cancer Res* 2011;13(5):R90.
- Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004;4(9):665-76.
- Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* 2001;7(5):552-6.
- Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 2006;25(43):5912-9.
- Offit K, Pierce H, Kirchoff T, Kolachana P, Rapaport B, Gregersen P et al. Frequency of CHEK2*1100delC in New York breast cancer cases and controls. *BMC Med Genet* 2003;4:1.
- Ohayon T, Gershoni-Baruch R, Papa MZ, Distelman Menachem T, Eisenberg Barzilai S, Friedman E. The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *Br J Cancer* 2005;92(6):1144-8.
- Osorio A, Endt D, Fernández F, Eirich K, de la Hoya M, Schmutzler R et al. Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 2012;21(13):2889-98.
- Osorio A, Rodríguez-López R, Díez O, de la Hoya M, Ignacio Martínez J, Vega A et al. The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the CHEK2 gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer* 2004;108(1):54-6.
- Parkin DM, Fernández LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 2006; 12 Suppl. 1:S70-80.

- Peelen T, van Vliet M, Bosch A, Bignell G, Vasen HFA, Klijn JGM et al. Screening for BRCA2 mutations in 81 Dutch breast-ovarian cancer families. *Br J Cancer* 2000; 82(1): 151-156.
- Peixoto A, Santos C, Rocha P, Pinheiro M, Príncipe S, Pereira D et al. The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114(1):31-8.
- Pelttari LM, Heikkinen T, Thompson D, Kallioniemi A, Schleutker J, Holli K, Blomqvist C, Aittomäki K, Bützow R, Nevanlinna H. RAD51C is a susceptibility gene for ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 2011;20(16):3278-88.
- Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drüsedau M et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 1997;17(3):341-5.
- Preisler-Adams S, Schönbuchner I, Fiebig B, Welling B, Dworniczak B, Weber BH. Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;168(1):44-9.
- Proestling K, Hebar A, Pruckner N, Marton E, Vinatzer U, Schreiber M. The Pro allele of the p53 codon 72 polymorphism is associated with decreased intratumoral expression of BAX and p21, and increased breast cancer risk. *PLoS One* 2012;7(10):e47325.
- Puget N, Gad S, Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S. Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. *Am J Hum Genet* 2002;70(4):858-65.
- Puget N, Torchard D, Serova-Sinilnikova OM, Lynch HT, Feunteun J, Lenoir GM, Mazoyer S. A 1-kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17. *Cancer Res* 1997;57(5):828-31.
- Pylkäs K, Erkkö H, Nikkilä J, Sölyom S, Winqvist R. Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. *BMC Cancer* 2008;8:146.
- Rashid MU, Gull S, Asghar K, Muhammad N, Amin A, Hamann U. Prevalence of TP53 germ line mutations in young Pakistani breast cancer patients. *Fam Cancer* 2012;11(2):307-11.
- Relton CL, Daniel CP, Fisher A, Chase DS, Burn J, Tawn EJ. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and the frequency of somatic mutations at the glycophorin A locus in newborns. *Mutat Res* 2002;502(1-2):61-8.

- Richardson C. RAD51, genomic stability, and tumorigenesis. *Cancer Lett* 2005; 218(2):127-39.
- Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 2009;17(6):722-31.
- Rodrigues MS, Machado CA, Pagnoncelli D, Avvad E, Paixão JC, Gallo CV. TP53 and XRCC1 polymorphisms and breast cancer prognosis: a case-case study. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66(6):1097-100.
- Romanowicz H, Smolarz B, Baszczyński J, Zadrożny M, Kulig A. Genetics polymorphism in DNA repair genes by base excision repair pathway (XRCC1) and homologous recombination (XRCC2 and RAD51) and the risk of breast carcinoma in the Polish population. *Pol J Pathol* 2010;61(4):206-12.
- Romero A, Pérez-Segura P, Tosar A, García-Saenz JA, Díaz-Rubio E, Caldés T, de la Hoya M. A HRM-based screening method detects RAD51C germ-line deleterious mutations in Spanish breast and ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129(3):939-46.
- Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2011;12(1):68-78.
- Rudnicka H, Debniak T, Cybulski C, Huzarski T, Gronwald J, Lubinski J, Gorski B. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Polish high-risk breast and ovarian cancer families. *Mol Biol Rep* 2013;40(12):6619-23.
- Saito Y, Fujimoto H, Kobayashi J. Role of NBS1 in DNA damage response and its relationship with cancer development. *Transl Cancer Res* 2013;2(3):178-189.
- Schmutte C, Tomblin G, Rhiem K, Sadoff MM, Schmutzler R, von Deimling A, Fishel R. Characterization of the human Rad51 genomic locus and examination of tumors with 15q14-15 loss of heterozygosity (LOH). *Cancer Res* 1999;59(18):4564-9.
- Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology* 2010; 23, S60–S64.
- Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 2010;23 Suppl 2:S60-4.
- Shao X, Grishin NV. Common fold in helix-hairpin-helix proteins. *Nucleic Acid Research* 2000;28(14):2643-2650.
- Shu XO, Cai Q, Gao YT, Wen W, Jin F, Zheng W. A population-based case-control study of the Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(12):1462-7.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer Statistics, 2013*. *Ca Cancer J Clin* 2013; 63:11-30.

- Sigurdson AJ, Hauptmann M, Chatterjee N, Alexander BH, Doody MM, Rutter JL, Struewing JP. Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes. *BMC Cancer* 2004;4:9.
- Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17):3628-36.
- Sluiter MD, van Rensburg EJ. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125(2):325-49.
- Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 1996;6(11):1029-49.
- Smith TR, Miller MS, Lohman K, Lange EM, Case LD, Mohrenweiser HW, Hu JJ. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett* 2003;190(2):183-90.
- Sokolenko AP, Rozanov ME, Mitiushkina NV, Sherina NY, Iyevleva AG, Chekmariova EV et al. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia. *Fam Cancer* 2007;6(3):281-6.
- Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer. *Carcinogenesis* 2010;31(12):2031-8.
- Steffen J, Nowakowska D, Niwińska A, Czapczak D, Kluska A, Piatkowska M et al. Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *Int J Cancer* 2006;119(2):472-5.
- Stegel V, Krajc M, Zgajnar J, Teugels E, De Grève J, Hočevlar M, Novaković S. The occurrence of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in Slovenian population. *BMC Med Genet* 2011;12:9.
- Suba Z. Triple-negative breast cancer risk in women is defined by the defect of estrogen signaling: preventive and therapeutic implications. *Onco Targets Ther* 2014;7:147-164.
- Suwaki N, Klare K, Tarsounas M. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2011;22(8):898-905.
- Swensen J, Hoffman M, Skolnick MH, Neuhausen SL. Identification of a 14 kb deletion involving the promoter region of BRCA1 in a breast cancer family. *Hum Mol Genet* 1997;6(9):1513-7.

- Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K. Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene* 2002;21(58):8967-80.
- Thacker J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* 2005; 219(2):125-35.
- Thomassen M, Gerdes AM, Cruger D, Jensen PK, Kruse TA. Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in western Denmark. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;168(2):168-71.
- Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9(3):221-36.
- Thompson ER, Boyle SE, Johnson J, Ryland GL, Sawyer S, Choong DY et al. Analysis of RAD51C germline mutations in high-risk breast and ovarian cancer families and ovarian cancer patients. *Hum Mutat* 2012;33(1):95-9.
- Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res* 2000; 459(1):1-18.
- Toyama T, Zhang Z, Nishio M, Hamaguchi M, Kondo N, Iwase H, Iwata H, Takahashi S, Yamashita H, Fujii Y. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007;9(3):R34.
- Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjäkoski K, Ojala S, Kilpivaara O et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 2002;71(2):432-8.
- Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 2012;33(11):2007-17.
- Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB. Base excision repair and cancer. *Cancer Lett* 2012; 327(1-2):73-89.
- Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006;295(12):1379-88.
- Wang J, Shete S. Using both cases and controls for testing Hardy-Weinberg proportions in a genetic association study. *Hum Hered* 2010; 69(3): 212-218.
- Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM et al. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(9):955-60.
- Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K, Hnateyko O, Piekutowska-Abramczuk D, Krajewska-Walasek M et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage

syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet* 2000;8(11):900-2.

- Vasickova P, Machackova E, Lukesova M, Damborsky J, Horky O, Pavlu H et al. High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. *BMC Med Genet* 2007;8:32.
- Weberpals JI, Clark-Knowles KV, Vanderhyden BC. Sporadic epithelial ovarian cancer: clinical relevance of BRCA1 inhibition in the DNA damage and repair pathway. *J Clin Oncol* 2008;26(19):3259-67.
- Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 2009;9(2):95-107.
- Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 967-986.
- Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J* 2001; 20(22): 6530-6539.
- Vuorela M, Pylkäs K, Hartikainen JM, Sundfeldt K, Lindblom A, von Wachenfeldt Wäppling A et al. Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130(3):1003-10.
- Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(8):2334-56.
- Yoon D, Wang Y, Stapleford K, Wiesmüller L, Chen J. P53 inhibits strand exchange and replication fork regression promoted by human Rad51. *J Mol Biol* 2004;336(3):639-54.
- Zhang G, Zeng Y, Liu Z, Wei W. Significant association between Nijmegen breakage syndrome 1 657del5 polymorphism and breast cancer risk. *Tumour Biol* 2013; 34(5):2753-7.
- Zhang Y, Zhou J, Lim CU. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res* 2006;16(1):45-54.
- Zheng Y, Zhang J, Hope K, Niu Q, Huo D, Olopade OI. Screening RAD51C nucleotide alterations in patients with a family history of breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124(3):857-61.
- Zhuo W, Zhang Y, Xiang Z, Cai L, Chen Z. Polymorphisms of TP53 codon 72 with breast carcinoma risk: evidence from 12226 cases and 10782 controls. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:115.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Ana Krivokuća je rođena 21. marta 1984. godine u Užicu. Užičku gimnaziju, prirodno-matematičkog smera završila je 2002. godine. Školske 2002/2003. je upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je na smeru Eksperimentalna biomedicina u februaru 2009. godine, sa prosečnom ocenom 9,46. Školske 2009/2010. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na modulu Biologija, smeru Genetika.

U toku osnovnih studija bila je stipendista Opštine Užice i Opštine Čajetina, a tokom prve dve godine poslediplomskih studija 2010/2011. godine, bila je stipendista Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. Zvanje istraživača pripravnika stekla je decembra 2009. godine, a zatim i zvanje istraživača saradnika januara 2011. godine. Od maja 2011. godine zaposlena je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u okviru Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, u Laboratoriji za molekularnu genetiku gde je i uradila eksperimentalni deo svoje doktorske teze na projektu Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije, odnosno Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ана Кривокућа _____

број индекса _____ Б3502/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мутације у генима који доприносе ризику за обољевање од карцинома дојке и/или јајника код BRCA1 и BRCA2 негативних високоризичних породица у Србији

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Ана Кривокућа

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Ана Кривокућа _____

Број индекса _____ Б3502/2009 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада _____ Мутације у генима који доприносе ризику за обољевање од карцинома дојке и/или јајника код BRCA1 и BRCA2 негативних високоризичних породица у Србији _____

Ментор _____ проф др Марина Стаменковић-Радак _____

Потписана _____ Ана Кривокућа _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала 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, _____

Ана Кривокућа

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Мутације у генима који доприносе ризику за обољевање од карцинома дојке и/или јајника код BRCA1 и BRCA2 негативних високоризичних породица у Србији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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, _____

Ана Кривокуца

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.