

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

mr Andreja Leskovic

**KINETIKA OPORAVKA DVOLANČANIH PREKIDA DNK
U ODGOVORU NA JONIZUJUĆE ZRAČENJE
I ALKILIRAJUĆE AGENSE *IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2011.

Mentori:

Dr Marina Stamenković-Radak
vanredni profesor
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Gordana Joksić
naučni savetnik
Instituta za nuklearne nauke "Vinča"

Komisija za pregled i ocenu doktorske disertacije:

Dr Marina Stamenković-Radak
vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Gordana Joksić
naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča"

Akademik Marko Anđelković
redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča".

Posebnu zahvalnost dugujem dr Gordani Joksić, za razumevanje i strpljenje, kao i za vreme koje mi je posvetila. Rukovodeći izradom ovog rada, ona je stručnim sugestijama i brojnim savetima doprinela da se izvede do kraja.

Zahvaljujem se prof. dr Marini Stamenković-Radak na pomoći, razumevanju i korisnim savetima kojima je značajno doprinela da rad dobije svoj konačni izgled.

Prof. dr Marku Anđelkoviću se zahvaljujem na stručnim savetima i sugestijama koje mi je pružio tokom pisanja rada.

Prof. dr Predragu Slijepčeviću sa Brunel Univerziteta u Velikoj Britaniji se zahvaljujem na stručnoj pomoći i saradnji.

Veliko hvala dr Vesni Vasić za stručnu pomoć, podršku i hrabrenje.

Zahvaljujem se prof. dr Mariji Guć-Šćekić i dr Dragani Vujić iz Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" na kolegijalnoj pomoći i saradnji.

Zahvaljujem se dr Mirjani Baltić i Lidiji Aleksić iz Instituta za onkologiju Vojvodine na stručnoj pomoći.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama Mladenu Vukčeviću i Dragani Divnić iz Laboratorije za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine Instituta za nuklearne nauke "Vinča" na pomoći oko zračenja.

Zahvaljujem se takođe i svim kolegama iz Laboratorije za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" na pomoći i lepoj saradnji.

Zahvaljujem se svim mojim prijateljima na razumevanju i podršci.

Ivani Joksić se zahvaljujem za stručnu pomoć i prijateljsku podršku.

Tatjani Momić se zahvaljujem na prijateljskoj pomoći i podršci u svakom trenutku.

Dragoj Sandri Petrović, najtoplije zahvaljujem za iskrenu i nesebičnu pomoć, podršku, veru i što je uvek bila uz mene.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici za pažnju, razumevanje i podršku da krenem ovim putem.

Mojim mališanima, Dimi, Eleni i Mili zahvaljujem što su mi pokazali šta je najvažnije i najvrednije u životu...

Mami
za beskrajnu ljubav

Kinetika oporavka dvolančanih prekida DNK u odgovoru na jonizujuće zračenje i alkilirajuće agense *in vitro*

Izvod

Sindromi genomske nestabilnosti nastaju kao posledica mutacija u genima koji kodiraju proteine uključene u odgovor na oštećenje i popravku DNK. Većina tih bolesti pokazuje slične *in vitro* ćelijske fenotipove; specifičan ćelijski ciklus, povećanu osetljivost na oksidativni stres i sklonost ka razvoju maligniteta. Jedan od retkih, ali sa aspekta razumevanja ćelijskog odgovora na ozledu DNK, značajnih sindroma genomske nestabilnosti je Fankonijeva anemija. Osnovno obeležje FA ćelijskog fenotipa je visok nivo spontanih hromozomskih prekida, koji se može povećati izlaganjem ovih ćelija alkilirajućim agensima, kao što su mitomicin C i diepoksibutan (DEB). Manje poznata i još uvek sporna karakteristika FA ćelija je njihova radioosetljivost. S obzirom da je primena jonizujućeg zračenja često jedina opcija u lečenju takvih bolesti pred transplantaciju kostne srži, proučavanje odgovora na jonizujuće zračenje i njihove radioosetljivosti je od fundamentalnog značaja. Osnovni cilj ovog istraživanja je bio ispitati odgovor na DNK oštećenja indukovana jonizujućim zračenjem i alkilirajućim agensima *in vitro* kod fibroblasta pacijenta obolelih od Fankonijeve anemije. Budući da Fankonijeva anemija pripada grupi oboljenja koje karakterišu defekti proteina uključenih u odgovor na oštećenja indukovana jonizujućim zračenjem, vršena je analiza γ -H2AX kao markera dvolančanih prekida. U ovom istraživanju je praćena kinetika oporavka dvolančanih prekida indukovanih zračenjem i diepoksibutanom kao alkilirajućim agensom u primarnim fibroblastima pacijenta obolelih od aplazije kostne srži, uključujući i FA pacijente, primenom γ -H2AX metode, analizom mikronukleusa, ćelijskog ciklusa, apoptoze i pojedinačnih nukleotidnih izmena ciljnih gena.

Rezultati su pokazali da se FA pacijenti mogu razlikovati od ostalih pacijenata sa aplazijom kostne srži (BMF), na osnovu γ -H2AX testa 24 h nakon izlaganja ćelija jonizujućem zračenju ($p < 0.05$). U FA ćelijama učestalost rezidualnih γ -H2AX fokusa je približno 3 puta veća u odnosu na BMF i kontrolne ćelije i u proseku 9 puta veća u odnosu na stanje pre zračenja ($p < 0.05$). Metod γ -H2AX je brz i osetljiv test, koji se može koristiti za neposrednu dijagnozu individualnog FA ćelijskog fenotipa. Kašnjenje u kinetici popravke zračenjem indukovanih dvolančanih prekida u FA fibroblastima može se smatrati merom konstitutivne radioosetljivosti pre određivanja i primene doze za transplantaciju hematopoetskih matičnih ćelija. Sa druge strane, CB-MN testom je nemoguće proceniti konstitutivnu radioosetljivost FA pacijenata, ali uočeno povećanje indukovanih mikronukleusa u FA grupi u odnosu na BMF grupu ipak ne isključuje primenu ovog testa kao dopunskog, posebno u većim studijama. Ćelije FA pacijenata imaju poremećaj u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze; nakon ozračivanja većina ćelija se zaustavlja u G2/M fazi, što je praćeno malim procentom ćelija koje podležu apoptozi, dok nakon tretmana DEB-om FA ćelije značajno kasne sa ulaskom u apoptozu. Pojedinačne nukleotidne izmene gena uključenih u puteve popravke DNK i regulaciju ćelijskog ciklusa ukazuju na lošiju prognozu i veću sklonost ka razvoju tumora pacijenta obolelih od FA u odnosu na BMF pacijente.

Naše istraživanje na FA fibroblastnim ćelijama potvrđuje da je ovo "oboljenje DNK reparacije" i istovremeno ukazuje koliki je značaj neoštećenog FA puta u očuvanju genomske stabilnosti. Utvrđeno kašnjenje u kinetici popravke zračenjem indukovanih dvolančanih prekida u fibroblastima FA pacijenata, pruža mogućnost za novi pristup u diferencijalnoj dijagnostici FA ćelijskog fenotipa i prediktivnim testovima za transplanataciju kostne srži.

Repair kinetics of DNA double-strand breaks induced by ionising radiation and crosslinking agents *in vitro*

Abstract

The genomic instability syndromes result from mutations in genes that encode proteins involved in response to DNA damage and repair. Most of these diseases show similar cellular phenotypes *in vitro*, the specific cell cycle, increased susceptibility to oxidative stress and susceptibility to malignancy. Fanconi anemia is a rare genomic instability syndrome characterized by diverse developmental abnormalities, progressive bone marrow failure (BMF) and predisposition to both hematological malignancies and solid tumors. The hallmark of the FA cellular phenotype is sensitivity to DNA cross-linking agents such as mitomycin C and diepoxybutane (DEB) and such sensitivity is used in the diagnosis of Fanconi anemia. However, results obtained after exposure of FA cells to ionizing radiation are not uniform.

The aim of this study was to investigate the response to ionizing radiation and cross-linking agents of Fanconi anemia fibroblasts *in vitro*. Assuming that Fanconi anemia belongs to human disorders that are conferred by defects in proteins that function in response to double strand breaks (DSBs), a newly developed marker of DSBs γ -H2AX, is used to study response and sensitivity to ionizing radiation. In this study, we evaluated repair kinetics of radiation and DEB-induced DNA damages in primary fibroblasts of bone marrow failure (BMF) patients including FA patients employing γ -H2AX assay, CB-MN test, cell cycle analysis, apoptosis assay and single nucleotide polymorphism in target genes.

Cell lines originating from FA patients displayed a significant delay in the repair of radiation-induced DNA DSBs relative to BMF and control cell lines ($p < 0.05$). The delay is especially evident at recovery time of 24 hours, and is seen as about 9-fold increase of residual γ -H2AX foci compared to self-state before irradiation ($p < 0.05$). In FA cells frequencies of residual γ -H2AX foci is approximately 3-fold higher compared to BMF and control cells. Delayed repair kinetics of FA cells confirms the nature of FA as a DNA repair disease, and at the same time gives an opportunity to make diagnosis of FA easier. The observed delay in repair kinetics of FA cells represents a special mode of intrinsic radiosensitivity, which can be exploited to discriminate FA from non-FA BMF patients and prevent major toxicity in standard dose-conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplantation. On the other hand, CB-MN assay is insufficient for estimation of the constitutive radiosensitivity of FA patients, but observed increase of induced micronuclei in the FA group compared to the BMF group, does not exclude its employment as supplementary diagnostic test. FA cells show abnormalities in the regulation of cell cycle and apoptosis. After irradiation majority of FA cells are permanently arrested in G2/M, which is followed with very low number of cells entering apoptosis, while after DEB treatment significant delay in entering apoptosis was observed. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and genes responsible for cell cycle regulation indicate an increased susceptibility toward malignancies in FA patients compared to BMF patients.

This study confirmed Fanconi anemia as the "DNA repair" disease and indicates significance of undamaged FA pathway in maintaining genomic stability. The delay in repair kinetics of FA cells gives an opportunity for straightforward diagnosis of individual FA cellular phenotype and helps as predictive test for bone marrow transplantation.

Skraćenice

AML	<i>akutna mijeloidna leukemija</i>
AT	<i>Ataksija teleangiektazija</i>
ATLD	<i>Ataxia telangiectasia-like disorder</i>
ATLD	<i>Ataxia telangiectasia-like disorder</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATM and Rad3-related-interacting protein</i>
BARD 1	<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>
BER	<i>bazni ekscizioni reper</i>
BLM	<i>Bloom syndrome protein</i>
BMF	<i>bone marrow failure, aplazija kostne srži</i>
BN ćelija	<i>binukleusna ćelija</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2, early onset</i>
BRCT	<i>C-terminal domain of a breast cancer susceptibility protein</i>
CB-MN test	<i>citokinezis blok-mikronukleus test</i>
CCND1	<i>cyclin D1</i>
CCNH	<i>cyclin H</i>
CDC25A/B/C	<i>cell division cycle 25 homolog A/B/C (S. pombe)</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p27^{Cip1}</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, p27^{Kip1}</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, p16</i>
CHK1/2	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
CK2	<i>casein kinase 2</i>
CtIP	<i>C-terminal binding protein interacting protein</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DEB	<i>diepoksibutan</i>
DNA-Pk	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DSBs	<i>double-strand breaks</i>
EXDL2	<i>exonuclease 3'-5' domain-like 2</i>
Exo1	<i>exonuclease 1</i>
FA	<i>Fankonijeva anemija</i>
FAAP100	<i>Fanconi Anemia Associated Protein, 100 kD</i>
FAAP24	<i>Fanconi Anemia Associated Protein, 24 kD</i>
FAN1	<i>Fanconi-associated nuclease 1</i>
FANCA-N	<i>Fankoni anemija komplementaciona grupa A-N</i>
FHA	<i>forkhead-associated domain</i>
FISH	<i>fluorescentna in situ hibridizacija</i>
HR	<i>homologous recombination</i>
H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
I-2	<i>protein phosphatase inhibitor-2</i>
ICL	<i>interstrand crosslinks</i>
IRIF	<i>ionizing radiation -induced nuclear foci</i>
Ku70/Ku80	<i>proteini neophodni za NHEJ</i>
LIG4	<i>ligase IV, DNA, ATP-dependent</i>
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i>

MDM2	<i>the murine double minute oncogene</i>
MDS	<i>mijelodisplastični sindrom</i>
MGMT AGT	<i>O⁶methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MHF1/2	<i>FANCM-interacting histone fold protein 1/2</i>
MMC	<i>mitomicin C</i>
MMR	<i>mismatch reparation</i>
MN	<i>mikronukleus</i>
MRE11	<i>meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i>
MRN	<i>Mre11-Rad50-Nbs1 kompleks</i>
MRX	<i>Mre11-Rad50-Xrs2 kompleks</i>
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrome,</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1, nibrin</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	<i>nukleotidnim ekscizionim reparam</i>
NFBD1	<i>nuclear factor with BRCT domains protein 1</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
PARP	<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase related kinase</i>
PP1	<i>protein phosphatase 1</i>
PP2A	<i>protein phosphatase 2</i>
RAD	<i>proteini reparacije DNK</i>
RAD9A	<i>RAD9 homolog A (S. pombe)</i>
Rap80	<i>receptor-associated protein 80</i>
RNF8	<i>RING finger protein 8</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SLX4	<i>structure-specific endonuclease subunit homolog (S. cerevisiae)</i>
SMC	<i>structural maintenance of chromosomes protein</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
TLS	<i>transleziona reparaciona sinteza</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TP53BP1/2	<i>tumor protein p53 binding protein 1/2</i>
TS	<i>template switch</i>
UAF1	<i>Usp1-associated factor 1</i>
UFBs	<i>ultrafine DNA bridges</i>
USP1	<i>ubiquitin specific peptidase 1</i>
XRCC	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells</i>
γ -H2AX	<i>fosforilisani H2AX histon</i>

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Hromatin	2
1.2. Dvolančani prekidi DNK.....	4
1.2.1. Signalne kaskade dvolančanih prekida.....	4
1.2.2. γ -H2AX-koordinator signaliziranja	8
1.2.3. Defosforilacija γ -H2AX.....	12
1.3. Putevi popravke dvolančanih prekida.....	13
1.3.1. Homologa rekombinacija.....	13
1.3.2. Nehomologo spajanje krajeva.....	15
1.4. Regulacija puteva popravke DNK i ćelijski ciklus	16
1.4.1. Popravka tokom G1 faze ćelijskog ciklusa	17
1.4.2. Popravka tokom S faze ćelijskog ciklusa	17
1.4.3. Popravka tokom G2 i M faza ćelijskog ciklusa.....	19
1.5. Kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i odgovor na oštećenje DNK.....	20
1.5.1. Kontrolna tačka G1/S	21
1.5.2. Intra S kontrolna tačka	22
1.5.3. Kontrolna tačka G2/M.....	22
1.6. Sindromi genomske nestabilnosti.....	23
1.6.1. Fankonijeva anemija.....	24
1.6.1.1. Kliničke karakteristike Fankonijeve anemije	26
1.6.1.2. Dijagnoza FA ćelijskog fenotipa.....	26
1.6.2. FA kandidat geni.....	27
1.6.3. Interakcija FA proteina: FA put	28
1.6.4. FA proteini i γ -H2AX.....	30
2. Cilj	32
3. Materijal i metode	33
3.1. Uzorci.....	33
3.2. Metode.....	34
3.2.1. Kultura limfocita periferne krvi.....	34
3.2.1.1. Analiza hromozomskih aberacija u limfocitima periferne krvi.....	34
3.2.2. Kultura fibroblasta.....	35
3.2.2.1. Analiza hromozomskih aberacija u fibroblastima	36
3.2.2.2. Analiza mikronukleusa u fibroblastima.....	36
3.2.2.3. Tehnika imunocitohemijske fluorescencije.....	37
3.2.2.4. Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze.....	38
3.2.2.5. Analiza pojedinačnih nukleotidnih izmena	39
3.2.3. Statistička analiza	39

4. Rezultati	40
4.1. Analiza spontane i indukovane hromozomske nestabilnosti-CB mikronukleusni test....	42
4.2. Analiza kinetike popravke spontanih i indukovanih dvolančanih prekida.....	49
4.2.1. Analiza dvolančanih prekida (γ -H2AX fokusa) indukovanih zračenjem.....	49
4.2.1.1. Analiza γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija i distribucija γ -H2AX fokusa nakon zračenja.....	52
4.2.1.2. Analiza učestalosti γ -H2AX fokus-pozitivnih i γ -H2AX fokus-negativnih mikronukleusa nakon zračenja	55
4.2.2. Analiza dvolančanih prekida (γ -H2AX fokusa) indukovanih DEB-om.....	58
4.2.2.1. Analiza γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija i distribucija γ -H2AX fokusa nakon tretmana DEB-om	60
4.3. Ćelijski ciklus i nivi spontane i indukovane apoptoze.....	63
4.3.1. Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze nakon zračenja.....	63
4.3.2. Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze nakon tretmana DEB-om	68
4.4. Analiza pojedinačnih nukleotidnih izmena	73
5. Diskusija	76
6. Zaključci	105
7. Literatura	107
8. Prilog	128
8.1. Spisak Slika i Tabela/List of Figures and Tables.....	128
8.2. Publikovani radovi iz doktorske disertacije.....	128

1. Uvod

DNK je u ćelijama prisutna u obliku dvolančanog molekula koji u kompleksu sa histonima i nehistskim proteinima čini hromatin. Strukturna stabilnost hromatina omogućuje funkcionisanje, razvoj i preživljavanje ćelije, a ostvaruje se dinamički, ravnotežom između neprestanog nastajanja i popravljanja DNK oštećenja.

Genom je konstantno izložen egzogenim i endogenim agensima koji oštećuju DNK. Nepopravljene ili pogrešno popravljene DNK lezije, indukovane fizičkim agensima, kao što je jonizujuće zračenje ili hemijskim agensima i oksidativnim stresom, mogu izazvati genomsku nestabilnost ili nekontrolisanu deobu ćelija ukoliko ćelije ne podlegnu apoptozi (Hoeijmakers, 2001; Khanna i Jackson, 2001; van Gent *i sar.*, 2001).

Budući da je očuvanje genomske integriteta ključno za razvoj i preživljavanje, ćelije su tokom evolucije razvile sofisticirane mehanizme za otkrivanje i popravku oštećenja molekula DNK. Putevi popravke DNK se povezuju sa ćelijskim ciklusom u mrežu poznatu kao "odgovor na DNK oštećenje" (engl. *DNA damage response*, DDR). Odgovor na oštećenje DNK ostvaruje se kroz aktivaciju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, modifikaciju histona u blizini mesta oštećenja i organizaciju hromatinskih enzima i proteina koji će učestvovati u popravci DNK (O'Driscoll i Jeggo, 2006).

Poremećaj u odgovoru na oštećenje DNK je karakteristika sindroma genomske nestabilnosti. Ovu heterogenu grupu oboljenja, među kojima je i Fankonijeva anemija, karakteriše gubitak kontrole ćelijskog ciklusa i povećana sklonost ka razvoju maligniteta. Dosadašnja istraživanja Fankonijeve anemije su utvrdila da oboleli imaju visok nivo spontanih hromozomskih aberacija, koji se povećava pod dejstvom alkilirajućih agenasa (Kalb *i sar.*, 2006). Nasuprot tome, odgovor na jonizujuće zračenje i njihova radioosetljivost su nedovoljno ispitani ili su rezultati kontroverzni. Budući da je primena jonizujućeg zračenja često jedina opcija u lečenju takvih bolesti pred transplantaciju kostne srži, proučavanje odgovora na jonizujuće zračenje i njihove radioosetljivosti je od fundamentalnog značaja.

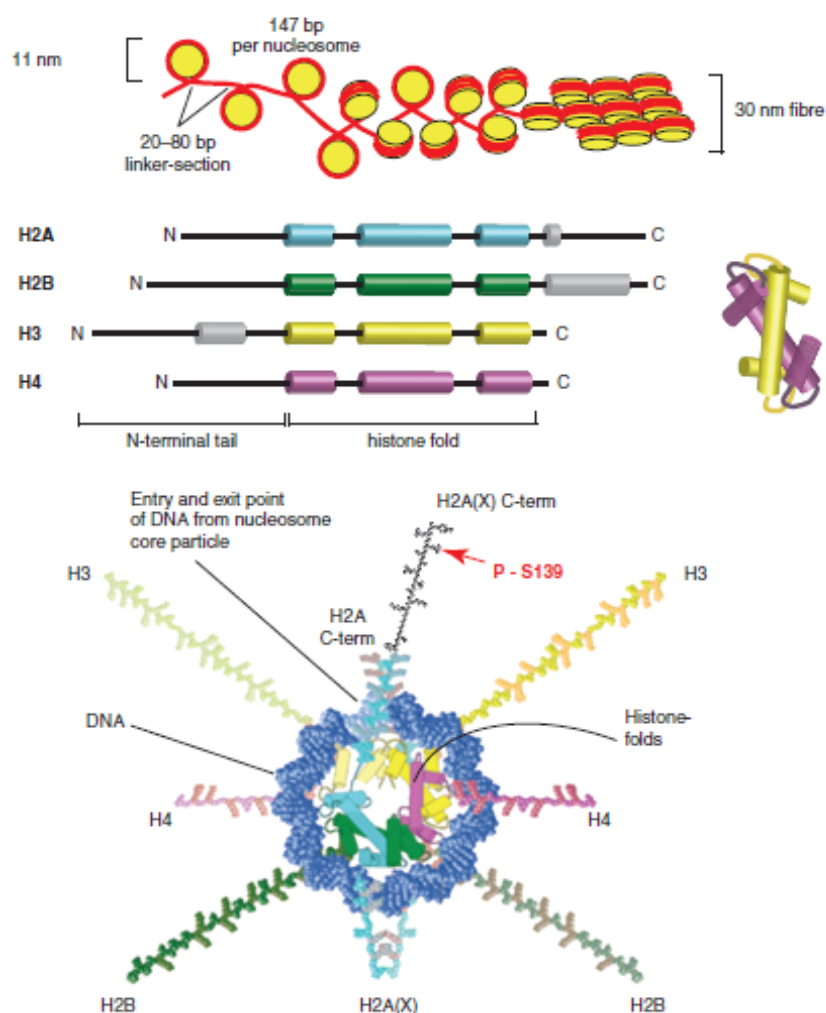
1.1. Hromatin

Hromatin je kompleks genomske DNK i proteina, histona i nehistskih proteina, koji omogućavaju specifično pakovanje DNK i imaju ulogu u zaštiti i regulaciji njene funkcije. Postoji pet glavnih klasa histona koji imaju ključnu ulogu u pravilnom pakovanju hromatinske niti. Po dve kopije molekula histona H2A, H2B, H3 i H4 grade oktamer histonskog jezgra oko koga se obmotava segment DNK dvostrukog heliksa. Približno 147 baznih parova DNK udružuje se sa jezgrom histona, stvarajući manje od dva navoja oko oktamera (Kinner *i sar.*, 2008). Nakon kratkog, tzv. "spacer" segmenta DNK (od 20 do 80 baznih parova), stvara se sledeći kompleks jezgro-DNK i tako naizmenično, dajući hromatinu izgled niski perlica (Slika 1.1.). Svaki kompleks DNK sa jezgrom se naziva nukleozom i predstavlja osnovnu jedinicu građe hromatina. Peti tip histona H1 se vezuje za ivicu svakog nukleozoma, u međunukleozomnom "spacer" regionu. Na taj način se duge niske nukleozoma dalje pakuju u sekundarnu helikoidnu strukturu, hromatinsku nit prečnika 30 nm (koja je približno tri puta deblja od nukleozomne niti). Ova cilindrična "solenoidna" nit predstavlja osnovni oblik organizacije hromatina. Sami solenoidi, hromatinske niti, se pakuju u petlje (područja, domene) koje su u intervalima od 100 kb vezane za nehistsku proteinsku osnovu ili matriks i grade hromosome (Misteli, 2007).

Stabilnost hromatina ostvaruje se vodoničnim vezama između DNK i histonskog jezgra. Da bi se obezbedila pristupačnost hromatinskoj strukturi i olakšale različite funkcije DNK, interakcije sa jezgrom histona su regulisane brojnim kovalentnim modifikacijama, te iako su im svi delovi histona podložni, one su najčešće rezervisane za duge "repove" ovih proteina (engl. *histone tails*). Modifikacije smanjuju afinitet histonskog repa prema susednim nukleozomima i tako posredno utiču i na strukturu hromatina (Kouzarides, 2007). Međutim, najznačajniji efekat histonskih modifikacija je da privuku specifične proteine. Grupisani proteini definišu i iniciraju biološke funkcije na način koji je usko vezan sa lokalnom hromatinskom strukturom.

Modifikacija hromatinske strukture ima ključnu ulogu u regulaciji popravke DNK (Groth *i sar.*, 2007). Na osnovu efekata na celokupan hromatin, DNK lezije

moгу biti klasifikovane u dve kategorije. Prva kategorija obuhvata oštećenja baza i nukleotida, kao i pojedinačne prekide DNK lanca. Ova oštećenja ne utiču na hromatinsku celovitost i popravka DNK ozleda je moguća sa ograničenim, lokalnim modifikacijama hromatinske strukture, upotrebom komplementarnog DNK lanca kao matrice. Druga kategorija oštećenja obuhvata DNK dvolančane prekide (engl. *double-strand breaks*, DSBs) i DNK-protein unakrsna vezivanja i može narušiti celovitost i funkciju hromatina. Ovaj tip DNK lezija destabiliše hromatin i time posredno deluje na signaliziranje i popravku na mestu oštećenja (Kinner *i sar.*, 2008).



Slika 1.1. Građa hromatina. Preuzeto iz Kinner *Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. *Nucleic Acids Research* (Kinner *i sar.*, 2008)

1.2. Dvolančani prekidi DNK

Dvolančani prekidi su biološki najletalnije DNK lezije. Mogu nastati kao posledica dva bliska, nezavisno nastala jednolančana prekida u suprotnim lancima ili kao posledica hidrolize fosfodiesterne veze u oba lanca istovremeno. U poređenju sa drugim tipovima DNK lezija, dvolančani prekidi su posebno složeni, jer je njihova "error-free" popravka moguća samo kroz kopiranje izgubljene sekvence sa različitim DNK molekula (ili nekog drugog dela istog molekula), budući da je komplementarni lanac takođe oštećen (Kinner *i sar.*, 2008).

Dvolančane prekide mogu indukovati egzogeni agensi, kao što su jonizujuće zračenje i određeni hemioterapeutske lekovi, ali takođe mogu nastati i endogeno u toku replikacije, V(D)J rekombinacije, mejoze ili usled skraćanja telomera (Hoeijmakers, 2001; van Gent *i sar.*, 2001). Priroda nastanka dvolančanih prekida određuje dalju obradu i put popravke nastalog oštećenja.

U biološkom smislu od posebnog značaja su dvolančani prekidi nastali delovanjem jonizujućeg zračenja. Jonizujuće zračenje indukuje ozlede DNK na dva načina, *direktno* depozicijom energije na genetički materijal i *indirektno* delovanjem sekundarno nastalih slobodnih radikala, posebno reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Joksić *i sar.*, 2000; O'Driscoll i Jeggo, 2006). Reaktivne vrste kiseonika i slobodni radikali, nastali delimičnom redukcijom kiseonika reaguju sa molekulima proteina, nukleinskih kiselina, lipida i ugljenih hidrata, što za posledicu ima povećanje fluidnosti ćelijskih membrana, inaktivaciju membranskih enzima, ubranu proteolizu, starenje, poremećen prenos signala u ćelijama, malignu transformaciju ili smrt ćelije.

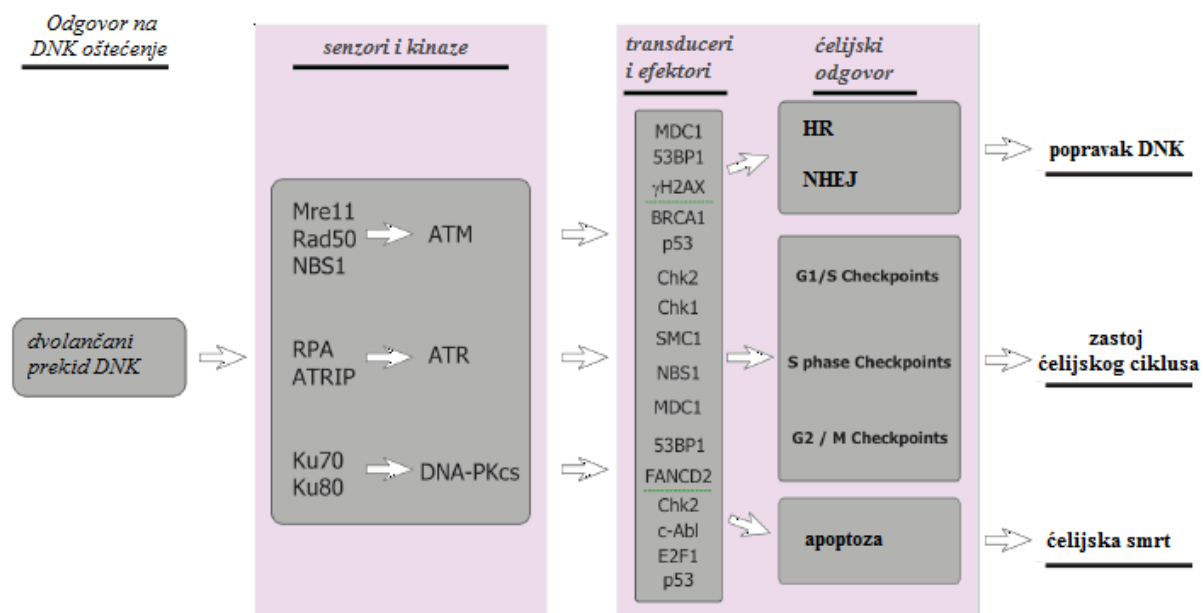
1.2.1. Signalne kaskade dvolančanih prekida

Nekoliko minuta nakon delovanja jonizujućeg zračenja na mestu dvolančane lezije grupišu se proteini (engl. *DNA damage response proteins*) i formiraju uočljive sub-jedarne strukture, "fokuse" (engl. *IR-induced nuclear foci*, IRIF) (Fernandez-

Capetillo *i sar.*, 2003). Indukovani fokusi su funkcionalno povezani sa dva fiziološka procesa, aktivacijom proteina na mestu oštećenja i iniciranjem puteva popravke (Fernandez-Capetillo *i sar.*, 2002; Lou *i sar.*, 2006).

Odgovor na dvolančani prekid ostvaruje se kroz sinhronizovano delovanje enzimskih sistema koji prepoznaju DNK leziju, a zatim aktiviraju različite nizvodne procese za njihovu popravku. U složenim procesima prenosa signala oštećenje DNK otkriva senzorni molekul, koji zatim aktivira kaskadu protein kinaza i pojačavanjem signalizacije okuplja na mesto oštećenja reparativne enzime, efektorne proteine, koji konkretno popravljaju DNK oštećenje (Slika 1.2.). Signalizacija na mestu dvolančanog prekida je izuzetno osetljiva i selektivna, jer se mora pokrenuti brzo i efikasno, čak i ako postoji mali broj dvolančanih prekida i mora ostati neaktivna pod drugim uslovima.

Ako dvolančani prekid ostane nepopavljen, može da dovede do trajnog zastoja ćelijskog ciklusa, apoptoze ili mitotske ćelijske smrti (Olive, 1998). Sa druge strane, ako se popravi sa greškom, to može da dovede do maligne transformacije kroz direktne ili naknadno nastale hromozomske rearanžmane (Morgan *i sar.*, 1998).

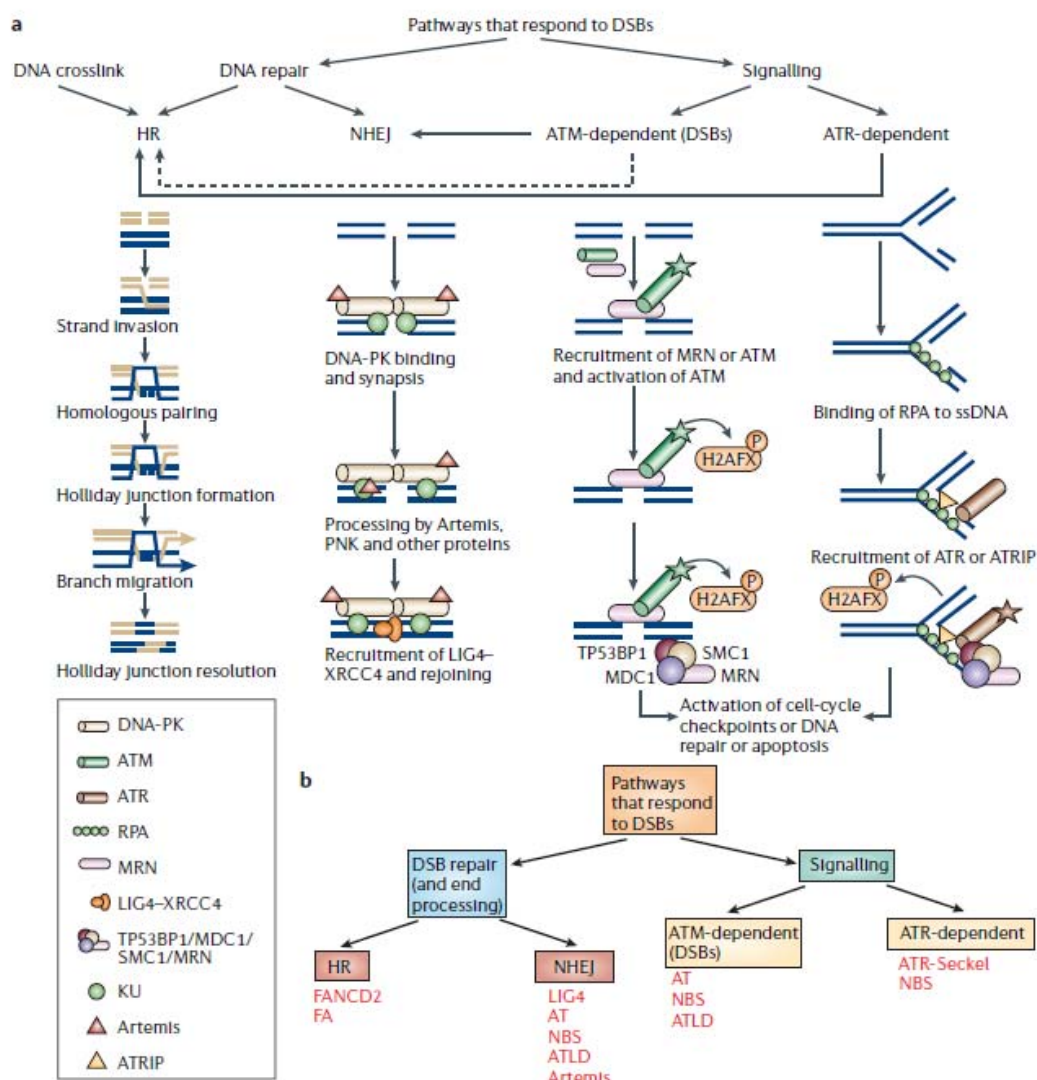


Slika 1.2. Odgovor na DNK oštećenje

Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleks proteina se smatra primarnim senzorom dvolančanog prekida. MRN kompleks prepoznaje dvolančane prekide DNK i grupiše protein kinazu ATM na mestu oštećenja stvarajući jedarne fokuse. Mesta dvolančanih prekida DNK lanca nakon delovanja MRN kompleksa poprimaju formu kratkih jednolančanih oligonukleotidnih nizova, koje prepoznaje ATM kinaza. ATM, DNA-Pk i ATR pripadaju porodici fosfatidilinositol kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*, PIKK) i imaju značajnu ulogu u grupisanju ostalih proteina primarnog repera dvolančanih prekida DNK. Aktivacija i vezivanje kinaza na mestu DNK lezije ostvaruje se direktnom interakcijom sa specifičnim faktorima NBS1 (za ATM), ATRIP (za ATR) i Ku 70 i 80 (za DNA-Pk) (Falck *i sar.*, 2005; You *i sar.*, 2005). Osim toga, ovi proteini učestvuju u regulaciji transkripcije, ćelijskog ciklusa i održavanju genomske stabilnosti (Dasika *i sar.*, 1999). ATM i DNA-Pk odgovaraju uglavnom na dvolančane prekide, dok se ATR aktivira jednolančanom DNK i zaustavljenom replikacionom viljuškom (Bartek i Lukas, 2007).

Kada se ATM grupiše na mestu oštećenja ona dalje fosforiliše histon H2AX, tj. aminokiselinu serin na 139 mestu (Slike 1.3. i 1.4.). Fosforilacija serina 139 (S-139) u H2AX predstavlja jednu od nekoliko modifikacija koje se događaju na karboksi kraju ovog proteina. H2AX se fosforiliše u γ -H2AX nekoliko sekundi nakon izlaganja ćelija jonizujućem zračenju i dostiže maksimum 30 minuta nakon aktivacije.

Sva tri glavna PIKK člana, ATM, ATR i DNK-Pk, imaju potencijal da fosforilišu H2AX i smatra se da je svaki od njih nosilac fosforilacije kada ostali nisu (Andegeko *i sar.*, 2001; Burma *i sar.*, 2001; Stiff *i sar.*, 2004). Među PIKK kinazama, ATM je najpogodnija za fosforilaciju H2AX zahvaljujući sposobnosti da se aktivira putem neposredne modifikacije lokalnog hromatina, koji je asociran sa DNK prekidom (Bakkenist i Kastan, 2003). Budući da modifikacija hromatina obuhvata ceo hromatinski region, ATM će fosforilisati nekoliko H2AX molekula unutar tog regiona. Sa druge strane, DNA-Pk se aktivira interakcijom sa Ku, nakon što se Ku direktno veže za DNK kraj i ima smanjen opseg fosforilacije H2AX (Wang *i sar.*, 2005). Iako joj je potreban NBS1 za optimalnu aktivnost, ATM se smatra glavnom kinazom koja fosforiliše H2AX pod normalnim fiziološkim uslovima (Hickson *i sar.*, 2004; Veuger *i sar.*, 2004; Friesner *i sar.*, 2005).



Slika 1.3. Putevi odgovora na dvolančane prekide. Preuzeto iz *The role of double-strand break repair - insights from human genetics*. Nature Reviews: Genetics (O'Driscoll i Jeggo, 2006)

Nasuprot direktno indukovanim DNK prekidima, dvolančane prekide nastale tokom replikacije prepoznaje ATR-kinaza (Ward i Chen, 2001; Limoli *i sar.*, 2002; Hanasoge i Ljungman, 2007), koja takođe fosforiliše H2AX. Potrebno je, međutim, istaći da se ATR aktivira kroz interakciju s ATRIP i da je primarna funkcija ove kinaze u prepoznavanju jednolančanih regiona DNK (Paulsen i Cimprich, 2007).

1.2.2. γ -H2AX-koordinator signaliziranja

Obeležavanje hromatina sa γ -H2AX na mestima indukovanih dvolančanih prekida predstavlja prvi signal za početak popravke nastalog oštećenja. Najnoviji literaturni podaci ističu visoko specifičnu molekularnu interakciju koja smešta γ -H2AX u rani odgovor na DNK oštećenje (Slika 1.4.), pri čemu se tačno određenim redosledom grupišu proteini: NBS1 (engl. *Nijmegen breakage syndrome 1*, nibrin), 53BP1 (engl. *p53-binding protein 1*) i MDC1 (engl. *mediator of DNA damage checkpoint 1*). Aktiviranje i organizacija ovih proteina se može smatrati jednim od najznačajnijih doprinosa γ -H2AX u odgovoru na oštećenje (Kobayashi *i sar.*, 2002; Stewart *i sar.*, 2003; Ward *i sar.*, 2003).

Kompleks MDC1/NFBD1 (engl. *nuclear factor with BRCT domains protein 1*), često označen samo kao MDC1, sadrži dva fosfospecifična protein vezujuća domena: FHA domen na N kraju i tandem BRCT domen na C kraju (dva BRCA1 C-terminalna domena). Kompleks MDC1/NFBD1 blizu mesta dvolančanog prekida na DNK interaguje svojim BRCT ostacima sa fosfoepitopima na karboksi kraju fosforilisanog histona H2AX i olakšava grupisanje ATM kinaze (Stucki *i sar.*, 2005). Literaturni podaci ukazuju da MDC1/NFBD1 BRCT ponovljeni domen pomaže γ -H2AX u prepoznavanju sledećeg DNK oštećenja. MDC1/NFBD1- γ -H2AX kompleks reguliše H2AX fosforilaciju i akumulaciju proteina neophodnih u odgovoru na DNK oštećenje (Stucki *i sar.*, 2005).

Interakcijom između MDC1 i γ -H2AX, mesto dvolančanog prekida je spremno za signaliziranje i popravku. MDC1 direktno interaguje sa NBS1 (Goldberg *i sar.*, 2003; Lukas *i sar.*, 2004), koji je u obliku MRN kompleksa takođe potreban za aktivaciju ATM (Falck *i sar.*, 2005; You *i sar.*, 2005). Ova interakcija se odvija preko fosforilacije MDC1 kazein kinazom 2 (CK2), koja potpomaže fosforilaciono-zavisne interakcije sa NBS1 preko FHA i dva BRCA domena. Na taj način, pozitivna povratna sprega generiše H2AX fosforilaciju. Po modelu pozitivne povratne sprege, gubitak MDC1 ekspresije ili smanjenje njegovog nivoa u ćeliji, redukuje H2AX

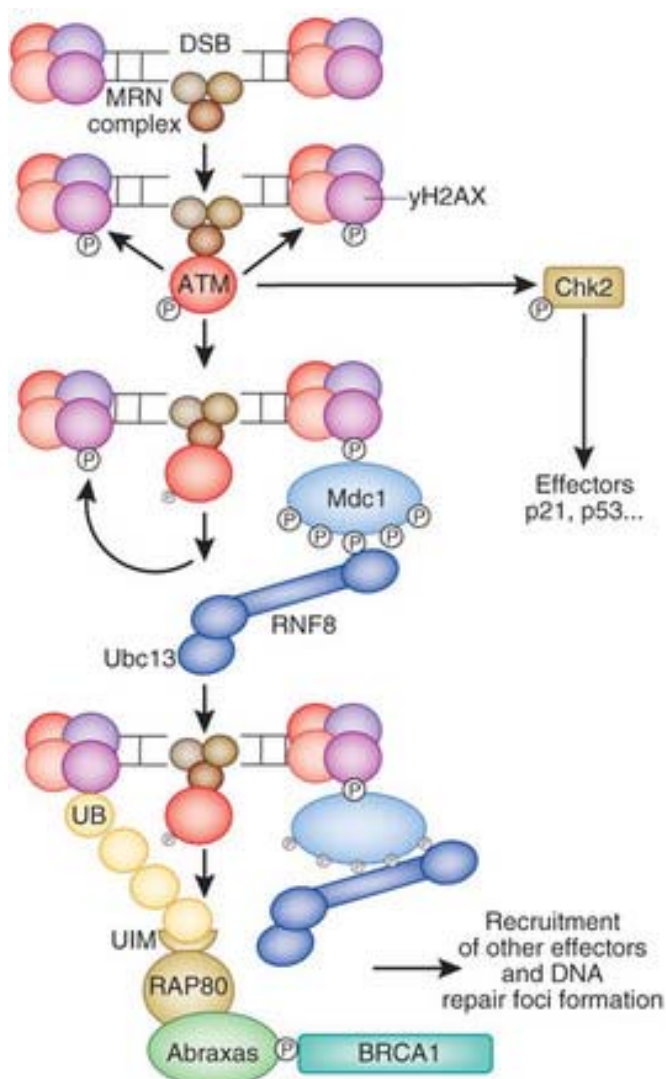
fosforilaciju, što za posledicu ima poremećaj u grupisanju i aktivnosti ATM kinaze (Stewart *i sar.*, 2003; Stucki *i sar.*, 2005; Lou *i sar.*, 2006) .

Pretpostavlja se da fosforilacija H2AX osim ATM kinazom može biti indukovana i delovanjem DNA-Pk, koja se vezuje za Ku, a koga inače karakteriše visok afinitet za oštećene DNK krajeve. DNA-Pk efikasno fosforiliše H2AX u odsustvu ATM, ali ako je ATM prisutna i inhibirana (delovanjem specifičnih inhibitora), DNA-Pk ne može fosforilisati H2AX, što ukazuje na dominantan negativni efekat inhibirane ATM na DNA-Pk kinazu (Hickson *i sar.*, 2004). Izuzetak su nibrin (NBS1)-deficijentne ćelije, gde DNA-Pk uspeva da značajno fosforiliše H2AX u uslovima inhibicije ATM (Falek *i sar.*, 2005), ukazujući na kompleksnu ulogu drugih proteina u signalizaciji dvolančanih prekida DNK. Nibrin vrši pregrupisanje ATM na mestima DNK oštećenja i omogućava komunikaciju sa DNA-PK/Ku kompleksom. ATM i DNA-Pk na mesto dvolančanog prekida mogu doći i direktnim vezivanjem za MDC1 (Lou *i sar.*, 2004; Lou *i sar.*, 2006), obezbeđujući tako dodatni nivo interakcije i regulacije. Uloga Ku, koga karakteriše visok afinitet za oštećene DNA krajeve i njegovo vezivanje za MRN kompleks je od ključne važnosti za regulaciju i izbor puta popravke molekula DNK.

Osim MDC1, 53BP1 takođe ima sposobnost da detektuje promene u hromatinu nakon indukcije dvolančanih prekida. Grupisanje 53BP1 na mestu dvolančanih prekida zavisi od regiona proteina koji sadrži dva uzastopna Tudor domena koji se mogu vezati direktno na metilovani histon H3 (Iwabuchi *i sar.*, 2003; Ward *i sar.*, 2003). Budući da je ova metilacija konstitutivna pod fiziološkim uslovima, 53BP1 će se aktivirati samo ako dođe do strukturne promene. Da bi se aktivirani 53BP1 efikasno akumulirao i zadržao u okviru hromatina koji sadrži dvolančani prekid neophodni su γ -H2AX i MDC1 (Celeste *i sar.*, 2002; Stewart *i sar.*, 2003; Ward *i sar.*, 2003; Lou *i sar.*, 2006). Pretpostavlja se da povezivanje MDC1 (sa NBS1) i γ -H2AX na mestima dvolančanih prekida izaziva promene u strukturi hromatina koje prepoznaje 53BP1 (Minter-Dykhouse *i sar.*, 2008).

Iako se NBS1 i 53BP1 grupišu na mestu dvolančanih prekida u odsustvu MDC1, oni se ne mogu akumulirati i prevremeno se disociraju sa oštećenog hromatina (Lukas *i sar.*, 2004; Bekker-Jensen *i sar.*, 2005), što pokazuje da procesi

inicijacije i propagacije mogu biti nezavisni. Istraživanja na kvascima i voćnim mušicama pokazuju da nakupljanje i modifikacije proteina u odgovoru na dvolančane prekide mogu biti pojačani ili smanjeni, zavisno od prisustva, odnosno odsustva γ -H2AX u hromatinskom kompleksu (Morrison *i sar.*, 2004; van Attikum *i sar.*, 2004; Park *i sar.*, 2006).



Slika 1.4. γ -H2AX-koordinator signaliziranja na mestu dvolančanog prekida DNK. Preuzeto iz *Post-translational modifications in signal integration*. Nature Structural & Molecular Biology (Deribe *i sar.*, 2010)

Iako je fosforilacija H2AX najznačajnija modifikacija hromatina uključena u koordinaciju odgovora na oštećenje DNK, nedavnim istraživanjima je ukazano na još jednu modifikaciju, ubikvitinizaciju, koja značajno doprinosi formiranju IRIF i koordinaciji signalizacije i popravke (Bennett i Harper, 2008). Dok konjugacija ubikvitinskih lanaca preko K48 stvara degradacioni signal, K63 vezani ubikvitinski lanci su uključeni u DDR signalizaciju (Pickart i Fushman, 2004; Sobhian *i sar.*, 2007). Istraživanja su pokazala da je E3 ubikvitin ligaza, RNF8, ključni enzim za ovu modifikaciju na mestima dvolančanih prekida (Huen *i sar.*, 2007; Wang i Elledge, 2007) i uključena je u lanac događaja iniciranih fosforilacijom H2AX (Slika 1.4.). Smatra se da ova modifikacija pojačava pregrupisanje 53BP1 u hromatinu, kao i da povezuje BRCA1-BARD1 kompleks sa IRIF pomoću proteina Rap80 i Abraxas.

Ovim interakcijama se između ostalog objašnjava i veza između MDC1 i MRN kompleksa. MDC1 olakšava povećanje i zadržavanje MRN kompleksa na mestima ozleda indukovanih jonizujućim zračenjem, potpomaže grupisanje drugih DDR proteina na mestu oštećenja, što ukazuje na njegovu ulogu „posrednika“ (Stucki i Jackson, 2006). ATM-om fosforilisani TQXF ostatak na MDC1 prepoznaje ubikvitin E3 ligazni enzim RNF8, koji zatim proizvodi ubikvitinske adukte na histonu H2A koji dovode do formiranja IRIF pomoću BRCA1 i 53BP1 (Huen *i sar.*, 2007; Mailand *i sar.*, 2007).

Iako mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni, utvrđena veza između fosforilacije proteina i ubikvitinizacije naglašava važnost posttranslacionih modifikatora kao molekularnih prekidača koji među brojnim ćelijskim procesima regulišu i odgovor na oštećenje DNK (Chapman i Jackson, 2008).

Svi gore opisani procesi pokazuju zašto se γ -H2AX nalazi u centru signalne kaskade pokrenute dvolančanim prekidom (Slika 1.4.). γ -H2AX je neophodan za inicijaciju odgovora, grupisanje i zadržavanje mnogih DDR proteina na mestu dvolančanog prekida (Celeste *i sar.*, 2002; Fernandez-Capetillo *i sar.*, 2002; Wang *i sar.*, 2002).

Glavna funkcija ovih interakcija je potpomaganje akumulacije i produžavanje interakcije DDR proteina u regionima oštećenog hromatina, što je neophodno za efikasnu i tačnu popravku dvolančanih prekida.

Fiziološka uloga fosforilacije H2AX u popravci DNK je još uvek predmet intenzivnog istraživanja. I dalje se malo zna o međusobnoj povezanost γ -H2AX i puteva popravke oštećene DNK, pre svega homologe rekombinacije (engl. *homologous recombination*, HR) i nehomologog spajanja krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ). Analize H2AX-deficijentnih embrionalnih matičnih ćelija (ES) miševa su pokazale da, iako H2AX nije neophodan za NHEJ ili HR, on moduliše efikasnost ovih puteva popravke (Celeste *i sar.*, 2003; Xie *i sar.*, 2004). Ćelije miševa kojima nedostaje H2AX su radiosenzitivne, pokazuju poremećaje u popravci oštećenja DNK i karakteriše ih visoka učestalost hromozomskih aberacija (Franco *i sar.*, 2006; Kao *i sar.*, 2006; Ramiro *i sar.*, 2006). Dosadašnja istraživanja sugerišu da γ -H2AX strukturnom reorganizacijom potpomaže puteve popravke (Riballo *i sar.*, 2004).

1.2.3. Defosforilacija γ -H2AX

Fosforilacija H2AX je signal destabilizacije hromatina dvolančanim prekidima. Nakon što oštećenje bude popravljeno, fosforilisani γ -H2AX mora biti preveden u H2AX. Drugim rečima, popravka treba da vrati strukturnu celovitost hromatinu. Ovo može biti učinjeno ili putem zamene γ -H2AX sa H2AX u nukleozomu ili defosforilacijom γ -H2AX direktno na nukleozomu. Fosfataza 2A (engl. *Protein phosphatase 2*, PP2A) je uključena u defosforilaciju γ -H2AX u ćelijama sisara (Chowdhury *i sar.*, 2005). Mehanizam delovanja PP2A je još uvek predmet istraživanja i ne zna se da li je potrebno uklanjanje γ -H2AX sa hromatina ili se defosforilacija odvija *in situ*. U tom smislu, delimične kolokalizacije γ -H2AX sa PP2A nakon oštećenja DNK su kompatibilne sa *in situ* defosforilacijom.

1.3. Putevi popravke dvolančanih prekida

Promena strukture hromatina je važna za sve puteve koje ćelija koristi da bi popravila nastala dvolančana oštećenja. Zajednička karakteristika svih puteva popravke dvolančanih prekida jeste da oni vraćaju strukturnu celovitost DNK, koja osigurava očuvanje hromatinske organizacije. Činjenica da se "error-prone" putevi popravke pretežno koriste za uklanjanje većine dvolančanih prekida kod viših eukariota (Iliakis *i sar.*, 2004), ukazuje da strukturni DNK integritet i očuvanje organizacije hromatina ima prioritet nad očuvanjem lokalne DNK sekvence u višećelijskim organizmima.

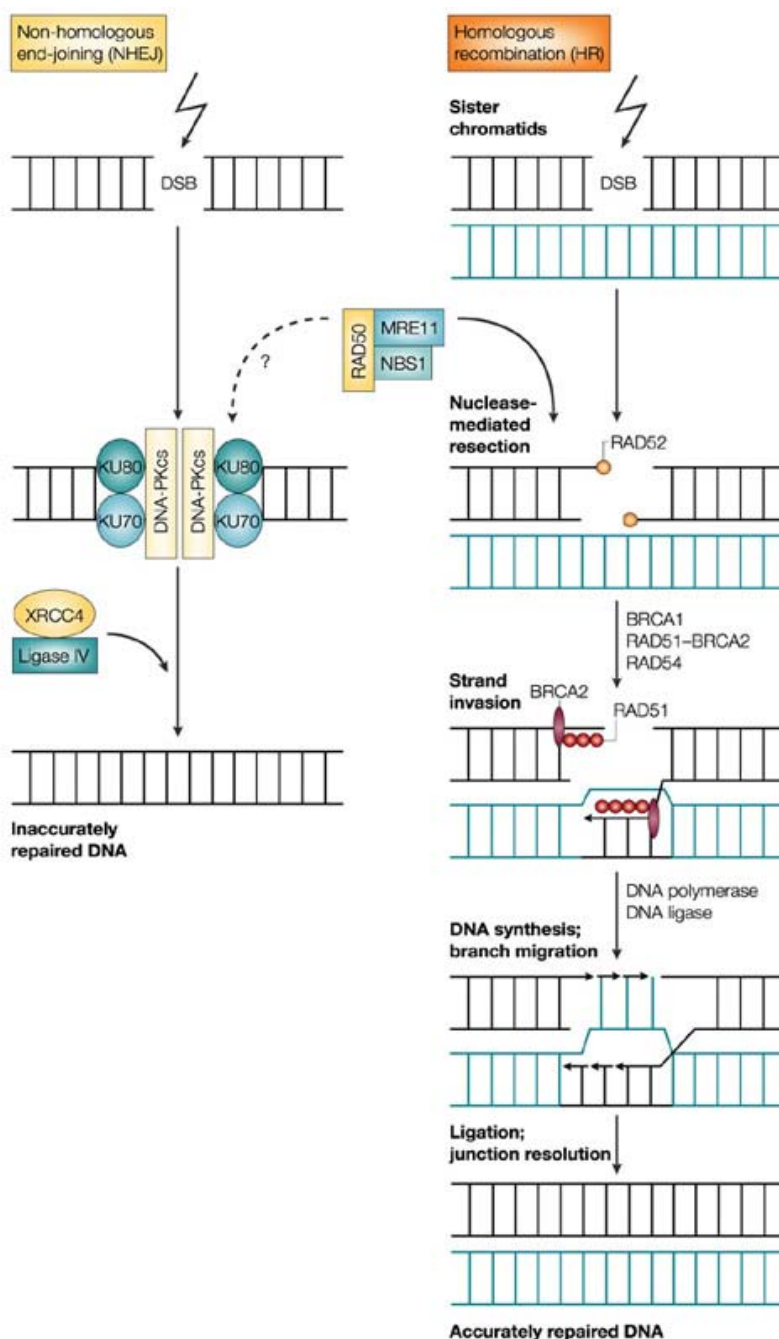
Kako bi savladala dvolančane prekide, ćelija je razvila dva mehanizma koji otkrivaju i popravljaju ovaj tip lezija; homologu rekombinaciju i nehomologu spajanje krajeva (Slika 1.5.).

1.3.1. Homologa rekombinacija

Rekombinacioni reparacioni put ili homologa rekombinacija (engl. *homologous recombination*, HR), popravlja dvolančane prekide korišćenjem genetičke informacije sadržane u neoštećenoj sestrinskoj hromatidi ili homologom hromozomu, precizno uspostavljajući originalne sekvence oko mesta dvolančanog prekida (Paques i Haber, 1999; Symington, 2002; West, 2003).

Ovaj "error free" put je katalizovan specifičnim enzimima i uključuje sledeće korake: prepoznavanje dvolančanog prekida u molekulu DNK, obrađivanje krajeva lanaca DNK, čime se formiraju invazivni lanci sa 3'OH krajevima, invaziju ili razmenu lanaca, sintezu DNK, ligaciju, formiranje Holidejeve petlje, migraciju grana i razrešenje rekombinacionog intermedijera. Proteini uključeni u HR su Rad52 grupa proteina (Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 i Xrs2) (Haber, 2000; Symington, 2002).

Homologa rekombinacija je glavni put za popravku dvolančanih prekida kod prokariota i jednoćelijskih eukariota, dok je kod viših eukariota ovaj put aktivan samo ako je u ćeliji prisutna sestrinska hromatida, koja se sintetisuje tokom S faze ćelijskog ciklusa.



Slika 1.5. Putevi popravke dvolančanih prekida DNK. Preuzeto iz *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nature Reviews: Cancer (Shiloh, 2003)

1.3.2. Nehomologo spajanje krajeva

Nehomologo spajanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) ili ilegitalna rekombinacija je konceptualno vrlo jednostavan put popravke kojim se prekinuti krajevi dovode u blizinu jedan drugome i međusobno direktno spajaju (bez prisustva dugih nizova homologih sekvenci) (Burma *i sar.*, 2006). Sistem je sklon greškama (engl. *error prone*) i može dovesti do stvaranja delecija koje su veličine od nekoliko bp do nekoliko Kb na mestu gde se dogodio dvolančani prekid. NHEJ put ima ključnu ulogu u popravci dvolančanih prekida kod viših eukariota, što je naročito izraženo u ćelijama koje se ne dele (terminalno diferencirane ćelije) i u ćelijama koje se nalaze u G1 fazi ćelijskog ciklusa, u uslovima nedostatka sestrinskih hromatida neophodnih za rekombinacioni reparacioni put.

Na mestu dvolančanog prekida aktivira se heterodimerni Ku kompleks (Ku70-Ku80), koji je glavni "*end binding*" faktor i vezuje se sekvencu-nespecifično za kraj dvolančane DNK. Ku kompleks je kružna struktura sa centralnim "otvorom" koji može da primi dvolančanu DNK. Unutrašnjost "otvora" sadrži pozitivno naelektrisane aminokiseline koje ostvaruju kontakte sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama DNK i omogućavaju Ku kompleksu da klizi duž DNK. Ku kompleks aktivira DNK protein kinazu DNA-Pk i Artemis protein (Collis *i sar.*, 2005). Sakupljeni zajedno na kraju DNK, Ku kompleks i DNA-Pk predstavljaju DNK zavisnu protein kinazu (DNAPK) (Pierce *i sar.*, 2001). U ovom kompleksu Ku heterodimer se pomera ka unutrašnjosti prekinutih DNK molekula, dok DNA-Pk ostaje na krajevima DNK.

Pored protein kinazne funkcije, DNA-Pk poseduje i funkcije primaze i nukleaze. DNA-Pk je glavni "*end bridging*" faktor u NHEJ putu, protein-protein interakcijama između dva DNA-Pk molekula premošćuju se krajevi DNK na mestu dvolančanog prekida. Artemis protein interaguje sa DNA-Pk i učestvuje u procesuiranju krajeva DNK i pripremi za njihovu ligaciju. Ovaj protein poseduje nukleaznu aktivnost koja je regulisana fosforilacijom sa DNA-Pk: 3' i 5' egz nukleaznu aktivnost, dok u kompleksu sa DNAPK poseduje i 3' i 5' endonukleaznu aktivnost (Collis *i sar.*, 2005). Sastavljanje DNA-Pk dalje za rezultat ima aktivaciju DNK ligaze IV i njenih asociiranih faktora (XRCC4 i PNK).

DNK polimeraze X familije (pol λ i pol μ) asociraju sa DNK koja je vezana sa Ku kompleksom i popunjavaju pukotine nastale u toku procesuiranja i popravke dvolančane lezije (Lieber, 2008). Na kraju, DNK ligaza IV lepi krajeve DNK čime se završava popravak dvolančanog prekida.

1.4. *Regulacija puteva popravke DNK i ćelijski ciklus*

Regulacija puteva popravke DNK je važna za integritet genoma i može se ostvariti modulacijom izbora puta popravke kada je lezija potencijalni supstrat za dva ili više puteva popravke, regulišući stabilnost ili aktivnost faktora popravke, ili regulacijom vremenskog razdoblja tokom koga se popravka može ostvariti.

DNK replikacija, razdvajanje, ciklusi kondenzacije i dekonenzacije odvijaju se pod kontrolom topoizomeraza, enzima koji uklanjaju torzioni poremećaj iz dvolančane DNK, prekidima i spajanjem jednog ili dva DNK lanca (Wang, 2002). Struktura i zbijenost hromatina su takođe regulisani preko ćelijskog ciklusa i mogu delovati regulatorno ili drugim post-translacionim modifikacijama (Groth *i sar.*, 2007; Karagiannis i El-Osta, 2007; Kouzarides, 2007).

Tokom poslednje dekade u velikoj meri je rasvetljena složenost različitih puteva popravke DNK. Utvrđeno je da post-translacione modifikacije (fosforilacija, ubikvitinizacija i sumoilacija) važne za regulaciju stabilnosti i aktivnosti komponenti regulatorne mašinerije, posredno regulišu i ćelijski ciklus. Ove post-translacione modifikacije deluju na grupisanje proteina popravke na mestima oštećenja DNK, često olakšavajući popravku u specifičnim fazama ćelijskog ciklusa, aktivacijom kontrolnih tačaka (Branzei i Foiani, 2008; Sakasai i Tibbetts, 2009).

Faza ćelijskog ciklusa je odlučujući faktor u kontroli puta popravke dvolančanih prekida (Lee *i sar.*, 1997).

1.4.1. Popravka tokom G1 faze ćelijskog ciklusa

Ćelije u G1 fazi mogu popraviti slučajna oštećenja, kao što su oštećenja nastala delovanjem endogenih reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) ili hemijskim agensima, UV ili jonizujućim zračenjem. Ova oštećenja mogu biti popravljena pre početka replikacije, baznim-ekscizionim reperom (BER) (Russo *i sar.*, 2004) ili nukleotidnim ekscizionim reperom (NER). Istraživanja su pokazala da iako NER ima važnu ulogu tokom G1 njegova aktivnost nije ograničena ovom fazom ćelijskog ciklusa. Takođe, važna karakteristika NER puta jeste da njegovi proteini učestvuju i podupiru druge sisteme popravke, kao i da zajedno sa HR proteinima učestvuju u popravci dvolančanih prekida (Sancar *i sar.*, 2004; Nojima *i sar.*, 2005).

Dvolančani prekidi mogu biti popravljani različitim putevima, od kojih su HR i nehomologo spajanje krajeva (NHEJ) najvažniji. Visoka kompaktnost hromatina i odsustvo sestrinskih hromatida su važni faktori koji čine NHEJ predominantnim putem popravke dvolančanih prekida tokom G1 faze ćelijskog ciklusa.

Izbor puta popravke takođe zavisi i od aktivnosti ciklin zavisnih kinaza, koja je snižena do S faze što za posledicu može imati inicijaciju i favorizovanje HR puta (Aylon *i sar.*, 2004; Jazayeri *i sar.*, 2006).

1.4.2. Popravka tokom S faze ćelijskog ciklusa

DNK sinteza je često povezana sa pogrešnom ugradnjom nukleotida, akumulacijom pukotina i diskontinuteta, promenom broja repetitivnih sekvenci, zastojem i aberantnom tranzicijom replikacione viljuške na mestu DNK oštećenja (Branzei i Foiani, 2005). Aberantne tranzicije replikacione viljuške dovode do torzionih promena koje mogu ugroziti stabilnost hromozoma ako se odmah ne poprave. Topoizomeraze prepoznaju ove promene i omogućavaju završetak S faze, kondenzaciju hromozoma i razdvajanje tokom G2 i M faze ćelijskog ciklusa.

Tokom S faze, popravka malih insercija i delecija nastalih usled replikacije ostvaruje se delovanjem "mismatch reper" puta (MMR) (Jiricny, 2006). Ovaj put prepoznaje i uklanja poremećaje koji se protežu na DNK, a zatim novom DNK sintezom popunjava prazninu. Hemijske promene u nukleotidnim bazama se često uklanjaju BER, kao u G1 fazi.

Jednolančani prekidi ili praznine se često javljaju tokom replikacije. U mitotskim ćelijama glavni put za njihovu popravku je HR (Lettier *i sar.*, 2006). Ćelije su razvile dva mehanizma koji potpomažu toleranciju oštećenja u S fazi. Prvi mehanizam je transleziona reparaciona sinteza (TLS), koja se koristi kada replikaciona mašinerija stigne do oštećenja koja prethodno nisu popravljena, a ometaju dalju replikaciju. Ovaj sistem koristi DNK polimeraze koje sintetišu DNK nezavisno od informacije u komplementarnom lancu, zbog čega je sistem veoma sklon greškama i ćelija ga koristi kao poslednji izbor. Drugi mehanizam je "template switch" (TS), "error-free" mehanizam koji ispunjava praznine u DNK uzorku (Branzei i Foiani, 2007; Lehmann *i sar.*, 2007). Put TS koristi neoštećene informacije sa sestrinske hromatide i pokazuje sličnosti sa HR mehanizmom.

Dvolančani prekidi se često mogu pojaviti tokom S faze kao posledica zastoja replikacione viljuške. Studije na kvascima su pokazale da je HR potpomognut proteinima *RAD52* grupe gena (Sung i Klein, 2006). HR zahteva 5'-3' "resekciju" dvolančanih prekida, proces koji zavisi od aktivnosti Exo1 i MRX kompleksa (Llorente i Symington, 2004; Nakada *i sar.*, 2004). MRX (MRN kod sisara) kompleks ima DNK-vezujuću, endonukleaznu i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost. Ovaj kompleks funkcioniše zajedno sa 5'-3' egzonukleazom sekući dvolančane prekide i formira jednolančane DNK sa 3'-krajevima što je neophodno za početak popravke. Takođe, studije na kvascima su pokazale da aktivnost ciklin zavisnih kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK) olakšava resekcioni korak HR i sprečava NHEJ (Aylon i Kupiec, 2004). Međutim, Ku heterodimer se može vezati za dvolančane prekide, što daje prednost NHEJ putu u odnosu na HR i potvrđuje da kompeticija ova dva puta popravke može postojati čak i za vreme S faze ćelijskog ciklusa (Kim *i sar.*, 2005).

Nadalje, utvrđeno je da dodatni faktori mogu sprečiti vezivanje Ku i time dati prednost HR putu. Studija na DT40 ćelijskim linijama pilića ukazala je da RAD18 i

poli (ADP-riboza) polimeraza (PARP) deluju tako što smanjuju afinitet vezivanja Ku za dvolančane prekide i time daju prednost HR putu popravke (Saber *i sar.*, 2007). Iako mehanizam kroz koji CDK olakšavaju HR u S fazi nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da u njemu učestvuje za MRE11-vezan faktor CtIP (engl. *C-terminal binding protein interacting protein*), koji se fosforiliše ciklin zavisnim kinazama (Barber i Boulton, 2006). Zanimljivo, nivo proteina CtIP je vrlo nizak tokom G1 i visok tokom S i G2 faze ćelijskog ciklusa. Smatra se da CtIP deluje zajedno sa MRN kompleksom isključivo tokom S i G2 faze ćelijskog ciklusa favorizujući HR put popravke (Limbo *i sar.*, 2007).

1.4.3. Popravka tokom G2 i M faza ćelijskog ciklusa

Ako praznine i dvolančani prekidi, koji se javljaju tokom replikacije ostanu nepopravljeni do kraja S faze, moraju biti popravljani pre mitoze. Za homologu rekombinaciju (tokom S i G2 faza) pomoću sestrinskih hromatida kao matrice, važno je da su sestrinske hromatide blizu jedna drugoj. Kohezija koja pruža fizičku povezanost sestrinskih hromatida iz S faze sve do njihovog razdvajanja tokom anafaze, zavisi u velikoj meri od kohezina, proteinskog kompleksa koji sadrži dva strukturalna čuvara hromozomskih proteina, SMC1 (engl. *structural maintenance of chromosomes protein 1*) i SMC3 (engl. *structural maintenance of chromosomes protein 3*), koji održavaju koheziju sestrinskih hromatida (Hirano, 2006). Kohezija mora biti uspostavljena tokom S faze, a taj proces zahteva dodatne proteine. Međutim, dvolančani prekid može pokrenuti koheziju nakon završetka replikacije DNK i taj događaj je neophodan za popravku sestrinskih hromatida u ćelijama u G2 fazi (Strom *i sar.*, 2007).

Mutacije koje deluju na kohezinski kompleks, odnosno faktore koji su potrebni za uspostavljanje kohezije, dovode do ozbiljnih defekata u popravci dvolančanih prekida (Unal *i sar.*, 2004).

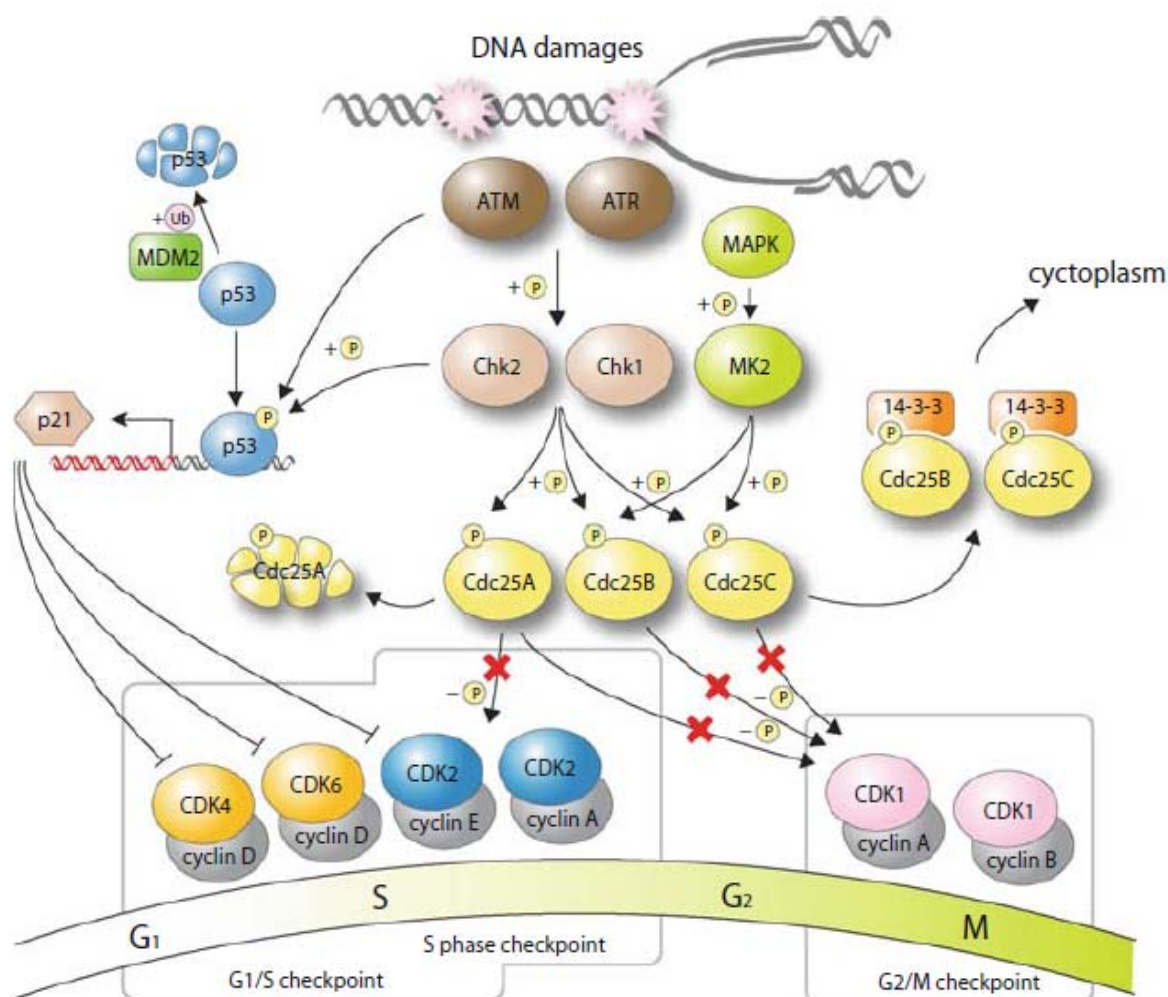
Topološki problemi koji nastaju kada dva replikona fuzionišu zajedno na kraju takođe treba da budu rastureni tokom S-G2 kako bi se sprečio nastanak hromozomskog prekida za vreme segregacije (Bermejo *i sar.*, 2007). Kada se dvolančani prekid dogodi tokom segregacije hromozoma, a za to vreme hromozomi su već vrlo kompaktni i potraga za homologijom je teška, popravka će se verovatno dogoditi od strane NHEJ u narednoj G1 fazi, ukoliko kontrolne tačke ili geni čuvari ne izazovu zastoj ćelijskog ciklusa tokom G2 ili M faze ćelijskog ciklusa (Franchitto *i sar.*, 2003).

1.5. Kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i odgovor na oštećenje DNK

Završna faza pokrenute signalne kaskade u odgovoru na oštećenje DNK ostvaruje se kroz aktivaciju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa (O'Driscoll i Jeggo, 2006). Kontrolne tačke su ćelijski nadzorni signalni putevi koji koordinišu popravak DNK sa hromozomskim metabolizmom i tranzicijom ćelijskog ciklusa (Branzei i Foiani, 2006; Bartek i Lukas, 2007).

Regulatorni proteini grupisani u DNK lezijama grade komplekse koji generišu prelazne DNK strukture i funkcionišu kao signali za aktivaciju regulatornog odgovora. Prenos signala ili aktivacija ovih mesta potpomognuta je različitim fosforilacionim događajima koji deluju na nivo transkripcije ili aktivaciju reparacionih gena i modulišu tok ćelijskog ciklusa, delujući na stabilnost ili aktivnost drugih proteina, koji su uključeni u regulatornu popravku ili napredovanje ćelijskog ciklusa (Slika 1.6.). Ključne komponente regulatorne mašinerije su već pomenute fosfatidilinositol kinaze ATM, ATR i DNA-Pk (Bartek i Lukas, 2007).

U odgovoru na dvolančane prekide, eukariotske ćelije aktiviraju kontrolne tačke, koje sprečavaju dalje napredovanje kroz ćelijski ciklus i na taj način doprinose "umrežavanju" ćelijskog ciklusa sa popravkom DNK. Kada se ATM i ATR grupišu na mestu oštećenja one dalje fosforilišu regulatorne kinaze-1 (CHK1) i 2 (CHK2) u cilju zaustavljanja sve tri kontrolne tačke; G1/S, intra S i G2/M.



Slika 1.6. Regulacija kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa nakon oštećenja DNK. Preuzeto iz *Cell Cycle Regulation and DNA Damage. The DNA damage response: Implication on Cancer Formation and Treatment* 2009, Springer, Dordrecht New York (Sakasai i Tibbetts, 2009)

1.5.1. Kontrolna tačka G1/S

Zastoj u G1/S kontrolnoj tački obezbeđuje duže vreme za popravku, pre nego što se pokrene replikacija, posredstvom aktivacije i stabilizacije tumor supresora p53. Ovaj protein zauzvrat aktivira transkripciju CDK2-ciklin E i p21. U ovom putu, BRCA1/BARD1 ATM zavisna fosforilacija Ser-15 na p53 povećava svoju aktivnost,

dok ATM istovremeno fosforiliše CHK2 i sprečava inhibiciju p53 i degradaciju od strane MDM2 (engl. *murine double minute oncogene*). Kao posledica individualnih post-translacionih modifikacija u aktivaciji p53 dolazi do disocijacije MDM2 i ponovnog uspostavljanja aktivnosti i stabilnosti p53 (Fabbro *i sar.*, 2004). Krajnji rezultat indukcije p53 je i aktivacija gena CDKN1A koji kodira p21^{Cip1} protein. P21 izaziva zastoj u G1 fazi ćelijskog ciklusa preko inhibicije CDK2 i CDK4 kompleksa. Nadalje, p21 može direktno inhibirati DNK sintezu *in vitro* vezivanjem za DNK polimerazni faktor, PCNA, što ukazuje na njegovu značajnu ulogu i u intra S fazi (Guardavaccaro *i sar.*, 2000).

1.5.2. Intra S kontrolna tačka

Zastoj u intra S kontrolnoj tački ćelijskog ciklusa usporava replikaciju. Aktivacija ATM-CHK2-CDC25A puta dovodi do inhibicije ciklina E/A-CDK2. Krajnji rezultat je sprečavanje ulaska CDC45 u hromatin, što inhibira otpuštanje preostalih replikacionih oridžina (Falck *i sar.*, 2002). Proteini posrednici (medijatori) na mestu DNK oštećenja (NBS1, FANCD2, SMC1 i BRCA1) preko ATM-zavisne fosforilacije odlažu napredovanje S-faze (Antoccia *i sar.*, 2008).

1.5.3. Kontrolna tačka G2/M

ATM/CHK2 reguliše zaustavljanje G2/M kontrolne tačke kako bi se sprečilo odvajanje oštećenih hromozoma. Ovo se događa održavanjem inhibicije CDK2/ciklin B1 preko CDC25C, čime se sprečava ulazak u mitozu (Taylor i Stark, 2001). Zastoj u G2/M kontrolnoj tački započinje sa detekcijom DNK oštećenja i aktivacijom pojedinačnih signalnih kinaza DNK oštećenja, ATM i ATR, i završava sa inaktivacijom CDK1. Iako se zaustavljanje u G2/M fazi ćelijskog ciklusa generalno događa kroz ATM-CHK2-CDC25A,B,C put, dosadašnje studije su pokazale da nakon izlaganja jonizujućem zračenju i ostali ATM-zavisni putevi imaju važnu ulogu, a

doprinos ATM i ATR u aktivaciji G2/M kontrolne tačke zavisi najvećim delom od faze ćelijskog ciklusa u kojoj se desilo oštećenje (Takai *i sar.*, 2002).

Jedan od proteina kandidata alternativnog puta je fosfataza, PP1 (engl. *protein phosphatase 1*). ATM indirektno stimuliše aktivnost PP1 fosfataze fosforilacijom njegovog inhibitorynog proteina, I-2. Posledica ATM-zavisne PP1 aktivacije je defosforilacija i inaktivacija Aurora kinaze, glavne kinaze na histonu H3 što za posledicu ima zastoj u G2/M nakon izlaganja jonizujućem zračenju (Tang *i sar.*, 2008). Ćelije koje se nalaze u S fazi u vreme ozračivanja akumulirajuće se u narednoj G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Ranije studije su ukazale da je za ovu aktivaciju neophodan ATR (Brown i Baltimore, 2003), kao i da CHK1 ima ključnu ulogu u aktivaciji G2/M kontrolne tačke u odgovoru na različite genotoksične stimulse (Sakasai i Tibbetts, 2009).

Imajući u vidu kompleksnost i funkcionalnu povezanost svih navedenih procesa, poremećaj u bilo kom koraku može voditi narušavanju integriteta genoma i razvoju bolesti. Dosadašnja istraživanja su ukazala na postojanje poremećaja na nivou odgovora ćelije na indukovana oštećenja kod pacijenata sa Fankonijevom anemijom, retkim sindromom genomske nestabilnosti.

1.6. Sindromi genomske nestabilnosti

Sindromi genomske nestabilnosti, u čijoj se osnovi nalaze defekti u putevima popravke DNK, nastaju kao posledica mutacija u genima koji kodiraju proteine uključene u odgovor na oštećenje i popravku DNK. Većina tih bolesti (Fankonijeva anemija, Ataksija teleangiektazija, Nijmegen sindrom i druge), pokazuje slične *in vitro* ćelijske fenotipove, kao što je osetljivost na jonizujuće zračenje, koje indukuje dvolančane prekide. Obolele pacijente karakteriše visok nivo spontanih hromozomskih aberacija, koji se povećava izlaganjem ćelija alkilirajućim agensima. Nasuprot tome, odgovor na jonizujuće zračenje i njihova radioosetljivost su nedovoljno ispitani.

Sindromi genomske nestabilnosti su veoma retka, uglavnom autozomalno recesivna oboljenja. Ataksija teleangiektazija i Nijmegen sindrom se javljaju nešto češće u odnosu na druge sindrome, tako da je većina dosadašnjih saznanja bazirana na njima kao model sistemima (Shiloh, 1997; Zhao *i sar.*, 2000).

Ataksija teleangiektazija (AT) nastaje usled mutacije u genu za ATM kinazu i za posledicu ima poremećaj popravke dvolančanih prekida nakon oštećenja DNK (Chun i Gatti, 2004). AT je multisistemski poremećaj koga karakterišu imunodeficijencije, sklonost ka malignitetima, posebno limfomima i leukemijama, kao i progresivna ataksija, odnosno gubitak Purkinjeovih ćelija cerebeluma (McKinnon, 2004). Na ćelijskom nivou, nedostatak ATM se manifestuje povećanom osetljivošću na jonizujuće zračenje i druge agense koji stvaraju dvolančane prekide DNK. Posebnu grupu čini ataksiji teleangiektaziji slična bolest (engl. *Ataxia telangiectasia-like disorder*, ATLD) za koju je utvrđeno da nastaje usled hipomorfne mutacije gena MRE11, koji je član MRN (MRE11-RAD50-NBS1) proteinskog kompleksa, važnog u odgovoru na indukovana oštećenja DNK.

Nijmegen sindrom (engl. *Nijmegen breakage syndrome*, NBS) nastaje kao posledica hipomorfne mutacije u NBS1, koji je takođe član MRN kompleksa. Protein nibrin, NBS1 ili P95 uključen je u odgovor ćelije na DNK oštećenja izazvana jonizujućim zračenjem. Obolele karakterišu imunodeficijencije, povećana učestalost hematopoetskih maligniteta i izražena radioosetljivost (Digweed i Sperling, 2004).

1.6.1. Fankonijeva anemija

Fankonijeva anemija (FA) je genetički heterogeno autozomalno recesivno i X-vezano oboljenje, koga karakteriše progresivna pancitopenija, aplazija kostne srži, široki spektar kongenitalnih anomalija i povećana predispozicija za razvoj maligniteta (Tischkowitz i Hodgson, 2003). Prosečna starosna granica pojave simptoma poremećene hematopoeze je 7 godina i jedino lečenje je transplantacija kostne srži, odnosno hematopoetskih matičnih ćelija, a i nakon toga preživeli imaju povećan rizik razvoja čvrstih tumora (Rosenberg *i sar.*, 2003).

Ćelije obolelih od FA pokazuju preosetljivost na alkilirajuće agense (engl. *crosslinking agents*), kao što su diepoksibutan (DEB), mitomicin C (MMC), cisplatin i melfalan koji stvaraju unakrsne veze DNK lanaca (engl. *interstrand crosslinks*, ICL), (Auerbach *i sar.*, 2001; Joenje i Patel, 2001; Alter, 2003) i indukuju povećan broj hromozomskih prekida (Tischkowitz i Elisabeth, 2004). DEB specifično pojačava hromozomsku nestabilnost ovih ćelija i zbog toga se koristi u diferencijalnoj dijagnozi Fankonijeve anemije kod bolesnika sa aplazijom kostne srži. Zbog preosetljivosti na alkilirajuće agense, smatra se da primarni poremećaj u FA ćelijama nastaje u odgovoru na oštećenje i/ili u popravci DNK.

Identifikovani geni odgovorni za nastanak Fankonijeve anemije mogu se podeliti u najmanje trinaest komplementacionih grupa (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M i N) (Song, 2009). Proteini kodirani FA genima (FA proteini) uključuju ubikvitin ligazu (FANCL/PHF9/POG) (Meetei *i sar.*, 2003), monoubikvitinizovan protein (FANCD2) (Garcia-Higuera *i sar.*, 2001), helikazu (FANCF/BACH1/BRIP1) (Levitus *i sar.*, 2005; Levrán *i sar.*, 2005), proteine sa helikaznom i nukleaznom sekvencom (FANCM) i proteine koji povećavaju predispoziciju za razvoj kancera dojke i ovarijuma (FANCD1/BRCA2) (Howlett *i sar.*, 2002). FA proteini, uključujući BRCA1 i BRCA2, učestvuju u zajedničkom procesu popravke DNK i deo su "FA-BRCA puta" odnosno "FA-BRCA mreže" (D'Andrea i Grompe, 2003; Venkitaraman, 2004).

Utvrđene su molekularne i funkcionalne interakcije FA proteina sa proteinima (ATM, MRE11, BLM, NBS1 i ATR) koji su odgovorni za druge retke sindrome genomske nestabilnosti (AT, ATLD, Bloom-ov sindrom, NBS) u odgovoru na DNK oštećenje (Taniguchi i D'Andrea, 2006).

Kod ljudi, mutacije u FA genima su pronađene u mnogim kancerima u opštoj populaciji (Turner *i sar.*, 2004; Couch *i sar.*, 2005). Poremećaji popravke DNK i kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, kao i poremećaji u FA putu, mogući su mehanizmi genomske nestabilnosti u kancerogenezi i mogu biti odgovorni za preosetljivost ćelija kancera na određene vrste hemioterapeutskih lekova i zračenje (Taniguchi *i sar.*, 2003; van der Heijden *i sar.*, 2004; Chen *i sar.*, 2005).

1.6.1.1. Kliničke karakteristike Fankonijeve anemije

Prevalenca FA se procenjuje na 1-5/milion, a učestalost heterozigotnih nosilaca iznosi 1/300 rođenih. FA pacijenti pokazuju ekstremnu kliničku heterogenost (Auerbach *i sar.*, 2001; Alter, 2003). Za dijagnozu, prosečna vrednost godina je 6.5 za dečake i 8 za devojčice, iako starosna dijagnoza obuhvata raspon od 0 do 48 godina. Dečaci obolevaju 1.24 puta češće od devojčica. Zajednički urođeni defekti kod FA pacijenata uključuju nizak rast, abnormalnosti kože, gornjih ekstremiteta, glave, očiju, bubrega, ušiju, gonada i razvojne invalidnosti. Značajan procenat (25 %-40 %) FA pacijenata je fizički normalan (Alter, 2003).

Hematološki, kod FA pacijenata dolazi do propadanja kostne srži, obično tokom prve dekade života. Statistički rizik za aplaziju kostne srži je 90 % do 40 godine života. Kod najmanje 20 % pacijenata sa FA razvija se malignitet. Statistički rizik za razvijanje hematoloških i nehematoloških neoplazmi je oko 30 % (Kutler *i sar.*, 2003). Kod otprilike 25 % FA pacijenata sa kancerom, malignosti prethodi dijagnoza FA (Alter, 2003). Najčešći maligniteti su akutna mijeloidna leukemija (AML) i mijelodisplastični sindrom (MDS). Najčešće hromozomske aberacije u FA-vezanim leukemijama su monozomija 7, duplikacija 1q i 3q (Auerbach i Allen, 1991; Tonnes *i sar.*, 2003). FA pacijenti su takođe podložni solidnim tumorima (Alter, 2003; Kutler *i sar.*, 2003; Rosenberg *i sar.*, 2003).

1.6.1.2. Dijagnoza FA ćelijskog fenotipa

Tretman FA ćelija alkilirajućim agensima, kao što je DEB, uzrokuje povećanje hromozomskih prekida i karakterističnu akumulaciju ćelija u G2 fazi ćelijskog ciklusa. Test DEB-indukovanih hromozomskih prekida (DEB test) se koristi kao standardni dijagnostički test za FA (Auerbach, 1993), iako ima brojne nedostatke, jer i pacijenti sa drugim retkim sindromima genomske nestabilnosti takođe mogu imati pozitivan nalaz testa (Nakanishi *i sar.*, 2002). Brzo i precizno dijagnostifikovanje FA, kao i određivanje FA podtipova (komplementacionih grupa FA pacijenata) je veoma

važno i intenzivno se radi na iznalaženju boljih i jednostavnijih metoda (Shimamura i D'Andrea, 2003). Danas se zna da pacijenti koji pripadaju komplementacionoj grupi C (FA-C) imaju znatno lošije preživljavanje od bolesnika komplementacionih grupa A i G (Kutler *i sar.*, 2003), kao i da je FA-D1 podtip povezan sa povećanom predispozicijom za meduloblastom, Wilmsov tumor i akutne leukemije u ranom detinjstvu, a klinički je drugačiji od ostalih podtipova (Offit *i sar.*, 2003; Hirsch *i sar.*, 2004; Wagner *i sar.*, 2004). Članovi porodice FA-D1 pacijenata mogu biti nosioci mutacije u BRCA2 i biti skloni razvoju kancera (Wagner *i sar.*, 2004).

Usled toga, da bi potvrdili dijagnozu, tj. razlikovali FA od drugih bolesti hromozomske nestabilnosti i omogućili svakom FA pacijentu i porodici kvalitetniji život, FA podtipovi bi se trebali rutinski određivati. Danas se uglavnom koriste složene metode za određivanje podtipova; esej ćelijske fuzije, kombinacija retrovirusnih prenosa gena i esej akumulacije u G2 fazi ćelijskog ciklusa ili kombinacija retrovirusnog prenosa gena i FANCD2 "imunobloting" (Shimamura *i sar.*, 2002; Shimamura i D'Andrea, 2003; Chandra *i sar.*, 2005).

1.6.2. FA kandidat geni

Prema najnovijim naučnim istraživanjima, postoji još nekoliko gena koji su ozbiljni kandidati ovog oboljenja.

Iako je poznato da paralogi RAD51 imaju ključnu funkciju u HR i zaštiti genoma, tek nedavno je otkriveno da mutacija u RAD51C dovodi do poremećaja sličnog Fankonijevoj anemiji (engl. *Fanconi anemia like disease*). Neki autori označavaju RAD51C kao FA-O, odnosno kao 14 FA gen (Kee i D'Andrea, 2010; Vaz *i sar.*, 2010). Dosadašnja istraživanja ukazuju da RAD51 deluje nizvodno od FANCD2 i da takođe moduliše homologi rekombinacioni put popravke.

SLX4 (engl. *structure-specific endonuclease subunit homolog (S. cerevisiae)*) prema nekim autorima već označen kao FANCP, ima važnu ulogu u odgovoru na DNK oštećenje, učestvuje u popravci tokom replikacije, značajan je regulator DNK puteva popravke i FA-BRCA puta (Kim *i sar.*, 2010).

Nedavno su otkrivene dve nukleaze koje učestvuju u popravci interlanačanih lezija, FAN1 (engl. *Fanconi-associated nuclease 1*) i EXDL2 (engl. *exonuclease 3'-5' domain-like 2*). Malo se zna o funkciji EXDL2. Za sada se pretpostavlja da deluje nizvodno od FANCD2. FAN1, kolokalizuje na mestima oštećenja DNK sa ID kompleksom na mestima interlančanih lezija, učestvujući na taj način u popravci, verovatno homologoj rekombinaciji i ponovnom uspostavljanju replikacije nakon zastoja replikacione viljuške. Zbog značajne uloge koju ima u modulaciji puteva popravke, FAN1 je novi gen kandidat za Fankonijevu anemiju (Liu *i sar.*, 2010; Smogorzewska *i sar.*, 2010).

Još dva gena, MHF1 i MHF2, su ozbiljni kandidati ovog oboljenja. Dosadašnja istraživanja ukazuju da su proteini MHF (engl. *FANCM-interacting histone fold proteins*) "neophodni za funkcionalnu celovitost FA puta". Svoju aktivnost ostvaruju preko FANCM i smatra se da gubitak MHF1 može ozbiljno ugroziti normalno funkcionisanje celog FA puta (Singh *i sar.*, 2010).

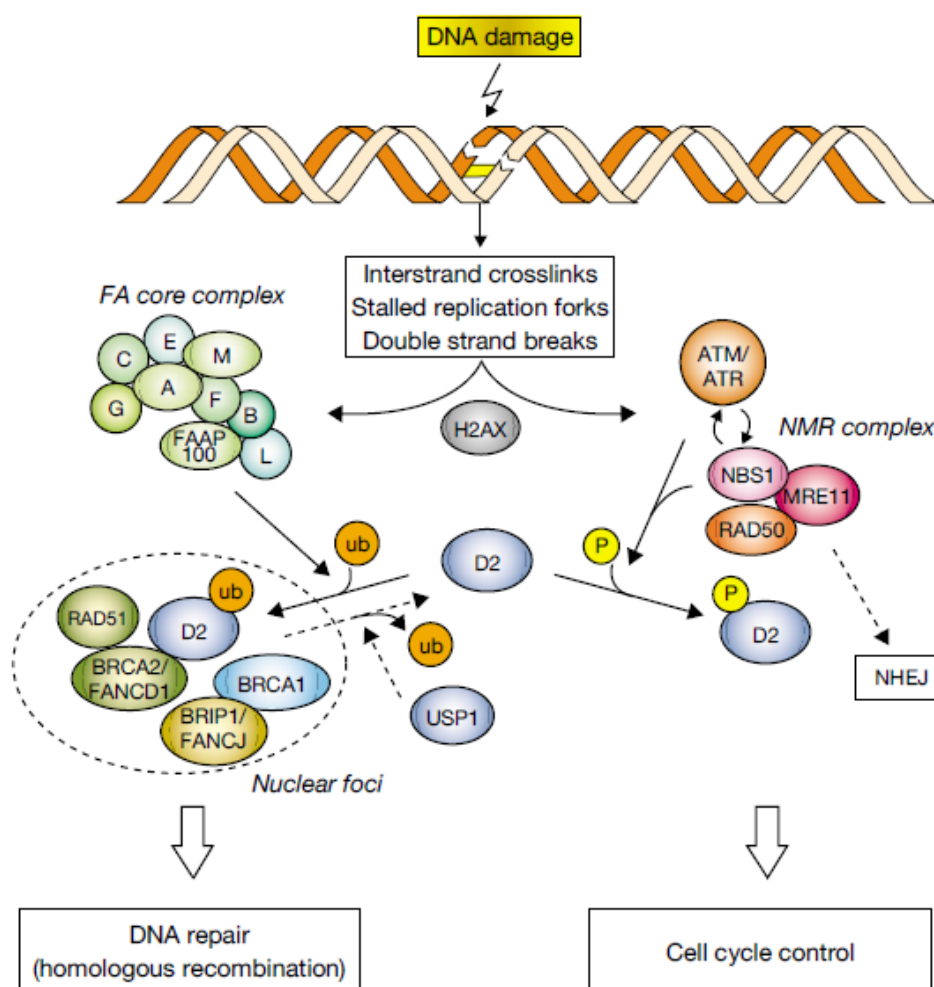
Trenutno se ispituje funkcionalnost ovih gena kod pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije i za očekivati je da će nova otkrića doprineti razumevanju mehanizama koji se nalaze u osnovi genomske nestabilnosti Fankonijeve anemije.

1.6.3. Interakcija FA proteina: FA put

Dugo godina je funkcija FA puta, ali i povezanost sa drugim putevima popravke, prevashodno HR i NHEJ u centru naučnih istraživanja. FA put se aktivira u odgovoru na oštećenje DNK (D'Andrea i Grompe, 2003), a ključni koraci su monoubikvitinizacija i nastanak jedarnih fokusa FANCD2 proteina (Slika 1.7.) (Garcia-Higuera *i sar.*, 2001).

Osam FA proteina (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL i FANCM) i dva FAAP proteina (FAAP24 i FAAP100) formiraju FA kompleks (engl. *FA core complex*) (Meetei *i sar.*, 2003). Osnovna uloga FA kompleksa je da putem FANCL koji poseduje E3 ubikvitin-ligaznu aktivnost monoubikvitiniše ID kompleks, koga sačinjavaju FANCD2 i FANCI (Wang, 2008).

Monoubikvitinizacija FANCD2 (konjugacija jednog molekula ubikvitina sa proteinom), neophodna je za njegov prenos u hromatin i formiranje FANCD2 jedarnih fokusa (Garcia-Higuera *i sar.*, 2001; Montes de Oca *i sar.*, 2005). Ovaj proces, pokrenut oštećenjem DNK, regulisan bilo membranskim prometom, funkcijom histona, regulacijom transkripcije ili popravkom DNK, ključan je korak u aktivaciji FA-BRCA puta (Garcia-Higuera *i sar.*, 2001).



Slika 1.7. FA/BRCA put, uloga FANCD2 proteina. Preuzeto iz *Fanconi Anemia: Causes and Consequences of Genetic Instability*. Genome and Disease. Genome Dynamics Vol. 1. 2006, Karger AG, Basel (Volf, 2006)

Monoubikvitinizovan FANCD2 dalje kolokalizuje sa drugim proteinima na mestima oštećenja i popravke DNK; signalnim kinazama, ATR i ATM, zatim BRCA1/BRCA2/RAD51 (Garcia-Higuera *i sar.*, 2001; Wang *i sar.*, 2004) i delimično sa FANCE, FANCC, NBS1, BLM i FANCI.

ATR je neophodan za monoubikvitinizaciju na mestu oštećenja i formiranje jedarnih fokusa FANCD2. Mada je specifičan mehanizam ovog procesa nejasan, poznato je da se FANCD2 može direktno fosforilisati ATR-om *in vitro* (Andreassen *i sar.*, 2004) i fosforilacija FANCD2 u odgovoru na interlančana unakrsna vezivanja DNK je zavisna od ATR (Pichierri i Rosselli, 2004). Usled toga, ATR-om posredovana fosforilacija FANCD2 može povećati monoubikvitinaciju FANCD2. Sa druge strane, ATR može fosforilisati neke komponente jedarnog FA kompleksa i povećati njegovu ubikvitin ligaznu aktivnost (Meetei *i sar.*, 2005).

BRCA1 je protein sa ubikvitin ligaznom aktivnošću. Iako je njegova uloga u *in vivo* monoubikvitinizaciji FANCD2 pod znakom pitanja, BRCA1, zajedno sa BARD1 može monoubikvitinizovati FANCD2 *in vitro* (Vandenberg *i sar.*, 2003). BRCA1 je neophodan za grupisanje FANCD2 i FANCD3, kao i RAD51 u jedarnim fokusima nakon oštećenja DNK (Cantor *i sar.*, 2001).

BRCA2 (FANCD1) učestvuje u grupisanju RAD51 proteina na mestu nastale ozlede, što je od izuzetnog značaja zbog uloge RAD51 u homologoj rekombinaciji (Digweed *i sar.*, 2002; Pichierri *i sar.*, 2002; Wang *i sar.*, 2004). Stvaranje RAD51 fokusa važan je marker za integritet uzvodne mašinerije homologe reparacije (Digweed *i sar.*, 2002; Pichierri *i sar.*, 2002; Wang *i sar.*, 2004).

Monoubikvitinizacija FANCD2 i FANCD3 je regulisan i reverzibilan proces. Ubikvitin-specifična proteinaza 1 (USP1) je deubikvitinizacioni protein i negativni regulator FA puta. USP1 zajedno sa kofaktorom UAF1, katalizuje deubikvitinizaciju i uklanja monoubikvitin sa ID kompleksa (Nijman *i sar.*, 2005; Wang, 2008).

1.6.4. FA proteini i γ -H2AX

Dosadašnja istraživanja su pokazala da iako histon H2AX nije neophodan za monoubikvitinizaciju FANCD2 u odgovoru na zračenje ili alkilirajuće agense, γ -H2AX je potreban za pravilnu akumulaciju aktivnog FANCD2 na mestu oštećenja. Ovim se ističe još jedna važna uloga histona H2AX, kao i da je γ -H2AX neophodan funkcionalni deo FA/BRCA puta (Bogliolo *i sar.*, 2007). Način na koji BRCA1 utiče

na akumulaciju FANCD2 na mestima DNK oštećenja još uvek nije precizno definisan, ali se pretpostavlja da BRCA1 posreduje u grupisanju FANCD2 od strane γ -H2AX na oštećenom hromatinu (Garcia-Higuera *i sar.*, 2001).

Smatra se da γ -H2AX reorganizacijom strukture hromatina na mestu dvolančanog prekida moduliše puteve popravke i potpomaže zadržavanje funkcionalnog kompleksa popravke (Fernandez-Capetillo *i sar.*, 2004; Xie *i sar.*, 2004). Pretpostavlja se da fosforilisani H2AX omogućava grupisanje i/ili zadržavanje aktivnog FANCD2 u hromatinu na mestu oštećenja zajedno sa BRCA1. Kada se lezija popravi, dolazi do inaktivacije FA puta, verovatno pomoću USP1. Druga mogućnost je da promena hromatina na mestu oštećenja posredovana sa γ -H2AX omogućava akumulaciju FANCD2 na oštećenom mestu i posledičnu interakciju FANCD2, ATR/ATM i ostatka uzvodnih komponenti FA/BRCA puta (Bogliolo *i sar.*, 2007; Lyakhovich i Surralles, 2007).

Dosadašnja istraživanja pružila su brojne podatke o ulozi funkcionalnog FA puta u popravljanju ne samo interlančanih unakrsnih veza, već i dvolančanih prekida DNK, postavljajući FANCD2 protein na centralno mesto koje povezuje FA/BRCA put sa putem popravke homologom rekombinacijom. Međutim, popravlanje ovih lezija u uslovima narušenog FA puta je i dalje predmet naučnih rasprava pre svega zbog nedovoljno poznate uloge FA proteina i njihovih mogućih interakcija sa drugim proteinima u ćeliji. H2AX se nalaze u centru dvolančane ozlede, a njihova analiza pružiće fundamentalna saznanja o putevima popravke molekula DNK, kontrole ćelijskog ciklusa i ćelijskog preživljavanja, što može doprineti dijagnozi i prognozi bolesti genomske nestabilnosti kakva je Fankonijeva anemija.

2. Cilj

Predmet istraživanja ove studije je DNK reparacija u primarnim ćelijama poreklom od pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije, nakon delovanja jonizujućeg zračenja i alkilirajućih agenasa, sa ciljem da se odgovori na pitanje da li poremećaj u DNK reparaciji postoji, a ako postoji da li predstavlja uzrok ili posledicu ove bolesti.

Da bi se ostvario naučni cilj sprovedena su sledeća ispitivanja:

1. Ispitivana je kinetika oporavka dvolančanih prekida DNK indukovanih jonizujućim zračenjem, testirana je radioosetljivost i progresija ćelijskog ciklusa nakon zračenja
2. Ispitivana je kinetika oporavka dvolančanih prekida DNK indukovanih alkilirajućim agensima, testirana je indukcija mikronukleusa i progresija ćelijskog ciklusa
3. Ispitivan je bazalni nivo dvolančanih prekida i postojanje "praga" nivoa dvolančanih prekida na DNK koji iniciraju proces popravke, apoptozu ili zastoj u ćelijskom ciklusu
4. Kinetika oporavka dvolančanih prekida testirana je kao metoda za diferencijalnu dijagnozu FA ćelijskog fenotipa i prognozu bolesti

3. Materijal i metode

3.1. Uzorci

Od januara 2006. do januara 2008. godine u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić" u Beogradu, uzorkovano je 27 pacijenata sa kliničkim nalazima aplazije kostne srži, bez pune kliničke slike Fankonijeve anemije ili bilo kakvog dokaza o osnovi etiologije. Različiti hematološki parametri, uključujući hemoglobin (2.1-14.9 g/dL), leukocite ($0.2-9.2 \times 10^9/L$) i neutrofile ($0.03-5.8 \times 10^9/L$) bili su u okviru raspona karakterističnog za obolele od aplazije kostne srži.

Za potvrdu FA ćelijskog fenotipa, kao prvi test korišćen je klasični diepoksibutan (DEB) test na limfocitima periferne krvi (Auerbach, 2003). Pozitivan DEB test imalo je pet pacijenata, deca (jedan dečak i četiri devojčice) u dobi od 8 ± 5 godina, dok je još pet pacijenata imalo granične vrednosti DEB testa. Od svih deset pacijenta korišćenjem minimalno invazivne standardne tehnike biopsije kože podlaktice uzeti su fragmenti kože debljine 3 mm i postavljene kulture fibroblasta. Fibroblasti su takođe bili testirani na DEB i hromozomske aberacije su analizirane prema kriterijumima Aurebacha (Auerbach, 2003). Rezultati na fibroblastima su potvrdili da je pet pacijenata DEB-pozitivno. Kod preostalih pet pacijenata nije utvrđeno prisustvo hromozomskih rearanžmana karakterističnih za Fankonijevu anemiju nakon DEB testa i oni su svrstani u grupu pacijenata sa nenaslednom aplazijom kostne srži (engl. *bone marrow failure*, BMF), BMF grupa. Kontrolne ćelijske linije su dobijene biopsijom kože zdravih donora sa plastične hirurgije.

U saradnji sa Institutom za humanu genetiku Univerziteta u Würzburgu, Nemačka (Prof. dr H. Hoehn i Prof. dr D. Schindler) i Odsekom za genetiku i mikrobiologiju Univerziteta u Barseloni, Španija (Prof. dr J. Surralles), Western blot analizom određene su komplementacione grupe DEB pozitivnih pacijenta (Shimamura *i sar.*, 2002). Od ukupno pet pacijenata utvrđeno je da jedan pripada FANCA (2229), a četiri pacijenta (1823, 1866, 1979 i 2093) FANCD2 komplementacionoj grupi.

Sve metode koje su korišćene u ovom radu odobrio je Etički odbor Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić" u Beogradu, uz informisani pristanak roditelja obolele dece.

3.2. Metode

3.2.1. Kultura limfocita periferne krvi

Za analizu hromozomskih aberacija iz kulture limfocita periferne krvi korišćeni su alikvoti heparinizirane pune krvi (0.5 mL) pacijenata.

3.2.1.1. Analiza hromozomskih aberacija u limfocitima periferne krvi

U 4.5 mL PB-MAX Karyotyping medijuma (Gibco, Invitrogen), dodato je 0.5 mL pune heparinizirane krvi. Kulture limfocita su gajene 72 sata na 37 °C. Paralelno su postavljane kulture koje su poslednja 24 sata tretirane DEB-om finalne koncentracije 0.1 µg/mL. Tri sata pre kraja kultivacije u sve kulture je dodat kolhicin finalne koncentracije 0.25 µg/mL.

Preparacija kultura je izvršena ispiranjem ćelijske suspenzije blagim hipotoničnim rastvorom 0.56 % KCl, 20 min. na 37 °C. Limfociti su zatim fiksirani u McCarnoy fiksativu (rastvoru metanola i sirćetne kiseline u odnosu 3:1), 3-4 puta. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min. na 1800 rpm, a supernatant aspiriran. Preparati su napravljeni nanošenjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Na plamenu osušeni preparati su obojeni 2 %-tnim rastvorom alkalne Gimze. Nakon bojenja, analizirano je sto kompletnih metafaza po ispitaniku na prisustvo spontanih i indukovanih hromozomskih prekida prema kriterijumima Auerbacha (Auerbach, 2003) i standardima "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN, 2005) na AxioImagerA1 mikroskopu (Carl Zeiss).

3.2.2. Kultura fibroblasta

Uzorci kože pacijenata i zdravih donora inkubirani su 2 sata u 5 mL hranjivog medijuma (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Invitrogen) obogaćen sa 15 % telećeg seruma (Newborn Calf Serum, Gibco, Invitrogen) i 1 % smešom antibiotik/antimikotik (Gibco, Invitrogen)), zatim isprani svežim medijumom sa antibiotikom i prebačeni u suhu sterilnu petri šolju. Koža je isečena skalpelom na komadiće i prebačena zakrivljenom pipetom u sterilan flask 25 cm² (T 25). Komadići kože su raspoređeni ravnomerno po celom flasku i naliveni sa 5 mL medijuma. Tako zasađene ćelije su aerirane gasnom smešom (vol., N₂ 90 %, O₂ 5.13 % i CO₂ 4.97 %) i ostavljene nedelju dana u inkubatoru na 37 °C.

Nakon formiranja jednog sloja ćelija, medijum je aspiriran, ćelije su zatim isprane fiziološkim rastvorom, tretirane sa 1 mL 0.05 % Tripsin-EDTA (Gibco, Invitrogen) i ostavljene u inkubatoru na 37 °C nekoliko minuta kako bi se odlepile od dna suda. Nakon toga, dodat je medijum sa serumom, ćelije su resuspendovane i prebačene u 2 nova flaska površine 25 cm². U ćelijske suspenzije dodat je svež hranjivi medijum do ukupne zapremine od 5 mL uz aeriranje. Kada su ćelije dostigle adekvatnu gustinu, pasažirane su istim postupkom u još jedan ili više sudova do dovoljne količine materijala za dalju analizu. Rast ćelija praćen je invertnim mikroskopom (Exacta-Optech GmbH).

Sve tehnike i metode u ovom radu primenjivane su na fibroblastnim ćelijama pacijenata i kontrolnim, fibroblastima zdravih osoba. Parametri su ispitivani paralelno na ćelijama koje su bile neozračene/netretirane, ozračene i tretiranim DEB-om.

Za ispitivanje efekata zračenja, fibroblastne ćelije su zračene izvorom γ -zračenja, ⁶⁰Co, dozom 2 Gy (0.45 Gy/min.). Dimenzije polja zračenja su iznosile 20 x 20 cm, a udaljenost od izvora iznosila je 71.1 cm.

Za praćenje efekata alkilirajućih agenasa ćelije su tretirane DEB-om, finalne koncentracije 0.01 µg/mL.

3.2.2.1. *Analiza hromozomskih aberacija u fibroblastima*

Za DEB-test na fibroblastnim ćelijama pacijenata, resuspendovane ćelije iz jednog flaska 25 cm², su podeljene u dva, dodat je svež medijum do ukupne zapremine 5 mL. Ćelije su inkubirane 72 sata na 37°C. Jedna kultura je poslednja 24 h tretirana DEB-om, finalne koncentracije 0.01 µg/mL. Tri sata pre isteka inkubacije u kulture je dodat kolhicin, finalne koncentracije 5 µg /mL. Nakon tripsinizacije, napred pomenutim postupkom, ćelijske suspenzije su prebačene u sterilne epruvete. Preparacija fibroblasta je izvršena ispiranjem ćelijske suspenzije blagim hipotoničnim rastvorom 0.32 % Na-citrata i 0.28 % KCl, 20 min. na 37 °C i fiksiranjem 2 puta u McCarnoy fiksativu. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min. na 1600 rpm, a supernatant aspiriran. Preparati su napravljeni nanošenjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla.

Analizirano je sto Gimzom obojenih metafaza po ispitaniku na prisustvo spontanih i indukovanih hromozomskih prekida, prema kriterijumima Auerbacha (Auerbach et al., 2003) i standardima "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN, 2005) na AxioImagerA1 mikroskopu (Carl Zeiss).

3.2.2.2. *Analiza mikronukleusa u fibroblastima*

Za CB-mikronukleusni test na fibroblastnim ćelijama, resuspendovane ćelije iz jednog flaska 25 cm², su podeljene u tri, dodat je svež hranjivi medijum do ukupne zapremine 5 mL. Ćelije su inkubirane 72 sata na 37 °C. Jedna kultura je ostala netretirana, druga je poslednja 24 h tretirana DEB-om, dok je treća ozračena izvorom γ-zračenja. U sve tri kulture je 48-og sata dodat citohalazin B (Sigma-Aldrich), finalne koncentracije 4 µg/mL.

Nakon tripsinizacije, ćelijske suspenzije su prebačene u sterilne epruvete. Preparacija je izvršena ispiranjem ćelijskih suspenzija blagim hipotoničnim rastvorom (0.56 % KCl + 0.9 % NaCl u odnosu 1:1) 5 min. na 37 °C i fiksiranjem u McCarnoy

fiksativu. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min. na 1600 rpm, a supernatant aspiriran.

Preparati su napravljeni nanošenjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Preparati su bojeni 2 %-tnim rastvorom alkalne Gimze. Analizirano je najmanje 500-1000 binukleusnih fibroblastnih ćelija po uzorku po kriterijumima Fenecha (Fenech, 1993).

3.2.2.3. Tehnika imunocitohemijske fluorescencije

Kulture fibroblasta su tripsinizirane sa 1 mL tripsina, zatim isprane i resuspendovane u 1 mL medijuma sa serumom. Na odgovarajući broj polilizinskih pločice (Sigma-Aldrich) je nanošeno 50 μ L ćelijske suspenzije i pločice su stavljane u sterilne, vlažne plastične petri šolje i inkubirane 24 h na 37 °C.

Odgovarajući broj fibroblastnih kultura na polilizinskim pločicama je ozračeno izvorom γ -zračenja. Paralelno su postavljene ćelije koje su tretirane DEB-om. Treći set kultura na polilizinskim pločicama nije tretiran (0 min.). Netretirane, ozračene i ćelijske kulture tretirane DEB-om su inkubirane na 37 °C. 30 min., 2 h, 5 h i 24 h nakon tretmana zračenjem i DEB-om ćelije su tretirane 4 % formaldehidom u fosfatnom puferu (PBS) 15 min., zatim kratko ispirane dejonizovanim PBS-om i potopljene u ohlađen 0.20 % Triton-X (Triton-X/PBS), 10 min. na +4°C. Nakon tretmana hladnim tritonom pločice su ispirane dejonizovanim PBS-om. Pločice su narednih 30 min. tretirane sa 100 μ l 0.5 % BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich), u vlažnoj mračnoj komori.

Nakon blokiranja ćelija sa BSA i ispranja PBS puferom na ćelije je nanošeno 60 μ l primarnog anti-fosfo H2AX (Ser 139) monoklonskog antitela (Upstate Cell Signalling Solutions), pločice su pokrivene parafilmom i ostavljene dva sata na sobnoj temperaturi, a zatim preko noći u vlažnoj mračnoj komori na +4 °C. Nakon skidanja parafilma, pločice su ispirane 2 puta po 5 min. TBST puferom (0.15 M NaCl, 20 mM Tris, 3 mM KCl, 0.05 % Tween 20, pH 7.4).

Nakon ispiranja, dodato je 60 μ l sekundarnog antitela obeleženog fluorescein izotiocianatom-FITC (Dako), preparati su zatim pokriveni parafilmom i ostavljeni u vlažnoj mračnoj komori na sobnoj temperaturi.

Dva sata nakon tretmana sekundarnim antitelom, preparati su ispirani 3 puta po 5 min. TBST puferom i dehidratirani po 5 min. u seriji hladnih etanola (70 %, 90 % i 100 %). Nakon sušenja na vazduhu, preparati su tretirani sa 15 μ l rastvora DAPI/Antifade, koncentracije 0.1 μ g/mL (MP Biomedicals), pokriveni pokrovnom pločicom i zalepljeni lakom.

Ćelije sa γ -H2AX fokusima analizirane su pomoću AxioImagerA1 mikroskopa (Carl Zeiss) sa AxioVision LE programom (AxioVs40 v4.7.1.0, Carl Zeiss). Slike su analizirane i obrađivane pomoću ImageJ v1.44 programa.

3.2.2.4. Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze

Za ispitivanje ćelijskog ciklusa i apoptoze, netretirane, ozračene i kulture fibroblasta tretirane DEB-om postavljane su u istim vremenskim intervalima (30 min., 2h, 5 h i 24 h) kao i za imunofluorescentnu tehniku (3.2.2.3.). Nakon tripsinizacije, kulture fibroblasta su prebačene u sterilne epruvete. Ćelijske suspenzije su isprane fiziološkim rastvorom (0.9 % NaCl) i fiksirane u McCarnoy fiksativu, 2 puta. Nakon toga ćelije su isprane 96 %-tnim etanolom i čuvane u ependorf tubama (Safe-Lock Tube, Eppendorf) na +4 °C.

Za određivanje ćelijskog ciklusa i procenta apoptotskih ćelija korišćen je hipodiploidni flow citometrijski metod, merenjem UV fluorescencije propidijum jodidom obojene DNK (Elstein *i sar.*, 1995).

Pre merenja ćelije su centrifugirane 10 min. na 2000 rpm, supernatant je odliven, a ćelijama je dodat fosfatni pufer (PBS) sa 50 μ g/mL propidijum-jodida i 100 μ g/mL ribonukleaze A. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani 30 min. na 37 °C u mraku. Ćelijski ciklus i apoptoza su mereni protočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson). Analizirano je 5000-10000 ćelija pomoću CellQuest programa (Becton Dickinson).

3.2.2.5. Analiza pojedinačnih nukleotidnih izmena

Za analizu pojedinačnih nukleotidnih izmena (engl. *single nucleotide polymorphism*-SNP) izolovana je DNK iz zamrznutih primarnih fibroblasta kože pacijenata. Izolacija DNK urađena je metodom fenol-hloroformske ekstrakcije. Odleđena ćelijska suspenzija je isprana fiziološkim rastvorom, centrifugirana 10 min. na 2000 rpm. Supernatant je aspiriran i ćelijskoj suspenziji je dodato 500 μ L 1xSTE pufera (10 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), 40 μ L proteinaze K (koncentracije 10 mg/mL) i 30 μ L 10 % SDS (natrijum dodecil sulfat), pH 7.2. Uzorci u ependorf tubama (Safe-Lock Tube, Eppendorf) su nakon toga inkubirani u vodenom kupatilu 2 sata na 55 °C. Nakon inkubacije, 250-300 μ L supernatanta je prebačeno u drugu tubu i dodato je 50 μ L ampulirane vode i 300 μ L fenola (Sigma-Aldrich). Nakon snažnog mućkanja do pojave bele boje, sadržaj je centrifugiran 10 min. na 12000 rpm. 250-300 μ L supernatanta je prebačeno u novu ependorf tubu, dodato je pola zapremine hloroforma (~150 μ L). Nakon centrifugiranja 10 min. na 12000 rpm, 250-300 μ L supernatanta je prebačeno u novu tubu i tretirano sa 150 μ L 7.5 M amonijum acetata i 1.5 mL ledenog 100 %-nog etanola, tube su okretane polako do pojave DNK. Sadržaj je centrifugiran 5 min. na 12000 rpm, supernatant dekantovan i talogu koga sačinjava DNK dodato je 30-50 μ L ampulirane vode. Koncentracija DNK je izmerena na Nano drop 1000 (THERMO Scientific).

Uzorci DNK koncentracije najmanje 1 μ g/ μ L analizirani su DNK čipom (Asper Biotech, Estonija).

3.2.3. Statistička analiza

Za statističku evaluaciju dobijenih rezultata korišćeni su Student-ov T-test i linearna regresiona analiza, "Statistika 8.0" i "OriginPro 8" za Windows Vistu.

4. Rezultati

Pacijenti obuhvaćeni ovim istraživanjem bila su deca sa aplazijom kostne srži, bez pune kliničke slike Fankonijeve anemije (FA) ili bilo kakvog dokaza o osnovi etiologije, dok je prvobitna dijagnoza postavljena na osnovu pregleda i subjektivnog utiska lekara.

Za potvrdu FA ćelijskog fenotipa korišćen je DEB test na limfocitima periferne krvi. Od ukupno 27 pacijenata, pet je bilo DEB-pozitivno, dok su ostali bili DEB-negativni. Kod pet DEB-negativnih pacijenata, zbog visoke sumnje na FA i isključenja eventualnog somatskog mozaicizma urađen je DEB test i na fibroblastima (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Spontane i DEB-indukovane hromozomske aberacije u limfocitima pacijenata sa aplazijom kostne srži

Pacijenti	Učestalost spontanih hromozomskih aberacija/ćeliji	Učestalost DEB-indukovanih hromozomskih aberacija/ćeliji
1	0.07	1.51
2	0.27	0.58
3	0.00	0.95
4	0.08	0.68
5	0.08	1.02
6	0.00	0.02
7	0.03	0.21
8	0.04	0.05
9	0.05	0.24
10	0.02	0.02

Test DEB-indukovanih hromozomskih aberacija na fibroblastima pacijenata sa aplazijom kostne srži, potvrdio je rezultate testa na limfocitima (Tabela 4.2.).

Komplementacione grupe DEB-pozitivnih pacijenta određene su Western blot analizom. Utvrđeno je da jedan pacijent pripada FANCA (2229), a četiri pacijenta (1823, 1866, 1879 i 2093) FANCD2 komplementacionoj grupi.

Preostalih pet pacijenata kod kojih je DEB test dao negativne rezultate svrstani su u grupu pacijenata sa nenaslednom aplazijom kostne srži (engl. *bone marrow failure*, BMF), BMF grupa.

Tabela 4.2. Spontane i DEB-indukovane hromozomske aberacije u fibroblastima pacijenata sa aplazijom kostne srži

Pacijenti	Učestalost spontanih hromozomskih aberacija/ćeliji	Učestalost DEB-indukovanih hromozomskih aberacija/ćeliji
1	0.08	0.54
2	0.05	0.49
3	0.18	0.41
4	0.06	0.32
5	0.04	0.68
6	0.01	0.05
7	0.01	0.06
8	0.02	0.02
9	0.00	0.01
10	0.01	0.01

Sve dalje analize rađene su paralelno u obe grupe pacijenata (FA i BMF) i odgovarajućoj kontrolnoj grupi, na primarnim fibroblastima (Tabela 4.3.).

Tabela 4.3. Primarne ćelijske linije; FA-pacijenti sa Fankonijevom anemijom, BMF-pacijenti sa aplazijom kostne srži i kontrolna grupa

Grupa	Primarna ćelijska linija	Komplementaciona grupa
FA	2229	FANC A
	1823	FANC D2
	1866	
	1879	
	2093	
BMF	1850	
	1990	
	2068	
	2083	
	3370	
Kontrolna	Kontrola 1	
	Kontrola 2	
	Kontrola 3	
	Kontrola 4	
	Kontrola 5	
	Kontrola 6	

4.1. Analiza spontane i indukovane hromozomske nestabilnosti-CB mikronukleusni test

Merena je učestalost mikronukleusa i proliferativni potencijal na fibroblastima svih pacijenata pre i nakon zračenja i tretmana DEB-om (Tabele 4.4.-4.12. i Slika 4.1.). Radioosetljivost je izračunata oduzimanjem vrednosti bazalne učestalosti mikronukleusa od indukovane. Za poređenje razlika srednjih vrednosti između kontrolnog uzorka i tretiranih uzoraka korišćen je t-test.

U tabelama je izražen broj mikronukleusa na 1000 pregledanih binukleusnih ćelija (MN/1000 BN ćelija), broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima (MN/mBN ćelija), procenat binukleusnih ćelija sa mikronukleusima (% mBN ćelija) i proliferativni indeks (PRI).

Tabela 4.4. Bazalna učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod FA pacijenata

FA pacijenti	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
2229	49.15	507	18	4	0	0	1.18	4.16	1.78
	46.37	476	17	3	0	0	1.15	4.03	1.83
	46.21	520	17	4	0	0	1.19	3.88	1.79
	47.24±1.65								1.80±0.03
1823	20.08	734	11	2	0	0	1.15	1.74	1.87
	18.52	637	10	1	0	0	1.09	1.70	1.86
	17.86	605	11	0	0	0	1.00	1.79	1.87
	18.82±1.14								1.87±0.01
1866	16.72	588	10	0	0	0	1.00	1.67	1.86
	17.27	627	9	1	0	0	1.10	1.57	1.88
	16.85	525	9	0	0	0	1.00	1.69	1.85
	16.95±0.29								1.86±0.02
1879	9.82	605	6	0	0	0	1.00	0.98	1.81
	9.38	528	5	0	0	0	1.00	0.94	1.76
	8.68	571	5	0	0	0	1.00	0.87	1.79
	9.29±0.57								1.79±0.03
2093	3.28	608	2	0	0	0	1.00	0.33	1.79
	2.91	685	2	0	0	0	1.00	0.29	1.76
	2.78	359	1	0	0	0	1.00	0.28	1.81
	2.99±0.26								1.79±0.03

FA pacijenti-pacijenti oboleli od Fankonijeve anemije; MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procenat binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

U grupi FA pacijenata, zapaženo je visoko značajno povećanje bazalne učestalosti mikronukleusa u uzorku 2229 u odnosu na kontrolne vrednosti ($t=9.75$, $p<0.0001$).

Bazalna učestalost MN kod pacijenata 1879 i 2093 je značajno smanjena ($t=-2.69$, $p<0.01$; $t=-4.77$, $p<0.0001$), dok kod uzoraka 1823 i 1866 nije utvrđena značajna razlika u odnosu na kontrolne vrednosti.

U svim uzorcima distribucija mikronukleusa sledi Poasonovu raspodelu; najveći broj binukleusnih ćelija je sa jednim i dva, najmanji sa tri i četiri mikronukleusa (Tabela 4.4.).

Analizom proliferativnog potencijala ćelija utvrđeno je značajno smanjenje kod svih uzoraka FA grupe u odnosu na kontrolu ($p<0.0001$).

Tabela 4.5. Bazalna učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod BMF pacijenata

BMF pacijenti	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
1850	8.24	602	5	0	0	0	1.00	0.82	1.91
	7.91	502	4	0	0	0	1.00	0.79	1.89
	7.68	646	5	0	0	0	1.00	0.77	1.89
	7.94±0.28								1.90±0.01
1990	8.01	619	5	0	0	0	1.00	0.80	1.89
	7.26	547	4	0	0	0	1.00	0.73	1.91
	6.98	569	4	0	0	0	1.00	0.70	1.90
	7.42±0.53								1.90±0.01
2068	11.93	497	6	0	0	0	1.00	1.19	1.87
	12.48	554	7	0	0	0	1.00	1.25	1.86
	13.14	602	6	1	0	0	1.14	1.15	1.86
	12.52±0.61								1.86±0.01
2083	14.20	486	7	0	0	0	1.00	1.42	1.92
	14.16	557	8	0	0	0	1.00	1.42	1.93
	13.31	594	6	1	0	0	1.14	1.16	1.89
	13.89±0.50								1.91±0.02
3370	9.09	654	6	0	0	0	1.00	0.91	1.87
	8.83	561	5	0	0	0	1.00	0.88	1.86
	8.01	619	5	0	0	0	1.00	0.80	1.90
	8.64±0.56								1.88±0.02

BMF pacijenti-pacijenti oboleli od aplazije kostne srži; MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procent binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

U BMF grupi utvrđeno je smanjenje bazalne učestalosti MN kod svih pacijenata (Tabela 4.5.) u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 4.6.), i to značajno kod 1850, 1990 i 3370 ($t=-3.14$, $p<0.005$; $t=-3.31$, $p<0.005$; $t=-2.91$, $p<0.01$). Distribucija mikronukleusa u svim uzorcima sledi Poasonovu raspodelu.

U svim uzorcima pacijenata BMF grupe proliferativni kapacitet ćelija je značajno niži ($p<0.05$) u odnosu na kontrolne uzorke, osim kod 1990 i 2083.

Tabela 4.6. Bazalna učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnoj grupi

Kontrolna grupa	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
Kontrola 1	9.72	612	4	1	0	0	1.20	0.81	1.91
	9.07	546	5	0	0	0	1.00	0.91	1.93
	8.73	568	5	0	0	0	1.00	0.87	1.94
	9.17±0.50								1.93±0.02
Kontrola 2	21.83	674	11	2	0	0	1.15	1.89	1.92
	20.99	514	9	1	0	0	1.10	1.91	1.93
	20.03	588	10	1	0	0	1.09	1.84	1.92
	20.95±0.90								1.92±0.01
Kontrola 3	19.12	514	8	1	0	0	1.11	1.72	1.94
	18.55	583	9	1	0	0	1.10	1.69	1.93
	17.51	506	7	1	0	0	1.13	1.56	1.89
	18.39±0.82								1.92±0.03
Kontrola 4	22.56	521	10	1	0	0	1.09	2.07	1.93
	20.69	568	12	0	0	0	1.00	2.07	1.91
	20.13	585	10	1	0	0	1.09	1.85	1.91
	21.13±1.27								1.92±0.01
Kontrola 5	24.03	530	9	2	0	0	1.18	2.03	1.88
	23.39	502	10	1	0	0	1.09	2.14	1.91
	20.08	734	11	2	0	0	1.15	1.74	1.91
	22.50±2.12								1.90±0.02
Kontrola 6	14.15	628	7	1	0	0	1.13	1.26	1.93
	12.54	551	7	0	0	0	1.00	1.25	1.93
	11.32	524	6	0	0	0	1.00	1.13	1.92
	12.67±1.42								1.93±0.01

MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procentat binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

Nakon zračenja u FA grupi utvrđeno je visoko značajno, povećanje učestalosti mikronukleusa kod 2229 ($t=5.39$, $p<0.0001$), dok je kod ostalih pacijenata FA grupe (Tabela 4.7.), utvrđeno značajno smanjenje ($p<0.05$) u odnosu na kontrolne uzorke (Tabela 4.9.). U svim uzorcima proliferativni potencijal je smanjen u odnosu na kontrolne, statistički visoko značajno; 2093 ($t=-5.64$, $p<0.0001$), 2229, 1866 i 1879 ($p<0.005$) i 1823 ($p<0.05$).

Tabela 4.7. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod FA pacijenata nakon zračenja

FA pacijenti	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
2229	109.20	484	25	7	6	0	1.50	7.28	1.57
	108.16	490	24	6	7	0	1.54	7.02	1.55
	104.97	507	22	7	7	0	1.58	6.63	1.58
	107.44±2.20								1.57±0.02
1823	50.71	470	21	2	0	0	1.09	4.67	1.59
	50.19	512	25	1	0	0	1.04	4.83	1.57
	48.54	492	21	2	0	0	1.09	4.47	1.60
	49.81±1.13								1.59±0.02
1866	29.47	462	12	1	0	0	1.08	2.74	1.56
	31.95	517	13	2	0	0	1.13	2.82	1.57
	31.25	528	15	1	0	0	1.06	2.94	1.57
	30.89±1.28								1.57±0.01
1879	13.16	451	4	1	0	0	1.20	1.10	1.59
	11.93	497	6	0	0	0	1.00	1.19	1.60
	11.56	514	4	1	0	0	1.20	0.96	1.54
	12.22±0.84								1.58±0.03
2093	34.72	558	16	2	0	0	1.11	3.13	1.54
	33.33	553	15	2	0	0	1.12	2.98	1.55
	32.63	596	14	3	0	0	1.18	2.77	1.54
	33.56±1.06								1.54±0.01

FA pacijenti-pacijenti oboleli od Fankonijeve anemije; MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procent binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

Tabela 4.8. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod BMF pacijenata nakon zračenja

BMF pacijenti	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
1850	76.49	515	11	2	6	2	1.95	3.92	1.63
	73.86	505	14	3	5	1	1.70	4.36	1.64
	73.07	456	16	3	3	1	1.52	4.80	1.62
	74.47±1.79								1.63±0.01
1990	9.36	637	3	0	1	0	1.50	0.62	1.67
	8.52	584	2	0	1	0	1.67	0.51	1.67
	8.28	479	4	0	0	0	1.00	0.83	1.66
	8.72±0.57								1.67±0.01
2068	26.27	521	10	2	0	0	1.17	2.25	1.59
	24.76	514	9	2	0	0	1.18	2.10	1.60
	20.79	519	9	1	0	0	1.10	1.89	1.59
	23.94±2.83								1.59±0.01
2083	27.68	533	6	0	3	0	1.67	1.66	1.61
	26.52	518	8	0	2	0	1.40	1.89	1.59
	26.02	529	6	1	2	0	1.56	1.67	1.61
	26.74±0.85								1.60±0.01
3370	26.04	563	11	2	0	0	1.15	2.26	1.58
	24.59	596	13	1	0	0	1.07	2.30	1.61
	24.26	564	12	1	0	0	1.08	2.25	1.55
	24.96±0.95								1.58±0.03

BMF pacijenti-pacijenti oboleli od aplazije kostne srži; MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procent binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

Učestalost MN nakon zračenja u BMF grupi je značajno smanjena u odnosu na kontrolne uzorke kod svih pacijenata ($p < 0.0001$) osim kod 1850 gde je učestalost MN ista kao u kontrolnoj grupi (Tabele 4.8. i 4.9.).

Utvrđeno je i značajno smanjenje proliferativnog indeksa kod 3370 i 2068 ($t = -2.95$, $p < 0.01$; $t = -2.28$, $p < 0.05$) i povećanje kod 1990 ($t = 2.65$, $p < 0.05$) u odnosu na kontrolu. U uzorcima 1850 i 2083 proliferativni kapacitet ćelija je isti kao u kontrolnim.

Tabela 4.9. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnoj grupi nakon zračenja

Kontrolna grupa	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
Kontrola 1	55.05	522	17	5	1	0	1.30	4.22	1.67
	54.10	513	18	4	1	0	1.26	4.29	1.64
	51.47	521	18	5	0	0	1.22	4.23	1.65
	53.54±1.85								1.65±0.02
Kontrola 2	72.73	623	28	7	2	0	1.30	5.61	1.64
	71.76	617	30	7	1	0	1.24	5.80	1.65
	70.57	548	26	6	1	0	1.24	5.68	1.61
	71.69±1.08								1.63±0.02
Kontrola 3	67.50	529	30	4	0	0	1.12	6.04	1.63
	64.98	523	26	5	0	0	1.16	5.60	1.61
	63.83	486	29	2	0	0	1.06	6.00	1.60
	65.44±1.88								1.61±0.02
Kontrola 4	87.81	524	23	8	2	1	1.44	6.09	1.63
	86.54	485	26	8	1	0	1.29	6.73	1.66
	84.56	512	22	7	2	1	1.44	5.88	1.64
	86.30±1.64								1.64±0.02
Kontrola 5	84.25	510	27	8	1	0	1.28	6.59	1.62
	80.88	509	26	9	0	0	1.26	6.43	1.62
	76.40	554	26	8	1	0	1.29	5.94	1.57
	80.51±3.94								1.60±0.03
Kontrola 6	62.11	611	27	5	1	0	1.21	5.12	1.64
	57.59	546	22	4	1	0	1.22	4.71	1.62
	57.89	543	21	6	0	0	1.22	4.74	1.59
	59.20±2.53								1.62±0.03

MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procentat binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

Učestalost MN nakon tretmana DEB-om u FA grupi je značajno povećana kod 2229 ($t = 4.06$, $p < 0.001$) i značajno smanjena kod 2093 ($t = -2.74$, $p < 0.01$). U ostalim uzorcima nije utvrđena značajna razlika u odnosu na kontrolne (Tabele 4.10. i 4.12.).

Nakon tretmana DEB-om utvrđeno je smanjenje proliferativnog potencijala kod svih pacijenata, značajno kod 2229 i 2093 ($t = -2.70$, $p < 0.05$; $t = -3.36$, $p < 0.001$).

Tabela 4.10. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod FA pacijenata nakon tretmana DEB-om

FA pacijenti	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
2229	81.03	511	23	6	3	0	1.38	5.89	1.49
	84.43	502	21	6	4	0	1.45	5.82	1.53
	82.86	498	25	5	3	0	1.33	6.21	1.54
	82.77±1.70								1.52±0.03
1823	53.89	481	13	7	0	0	1.35	3.99	1.57
	52.24	514	16	6	0	0	1.27	4.10	1.58
	51.76	463	15	5	0	0	1.25	4.14	1.56
	52.63±1.12								1.57±0.01
1866	34.48	533	17	1	0	0	1.06	3.27	1.58
	33.53	490	17	0	0	0	1.00	3.35	1.56
	32.97	528	18	0	0	0	1.00	3.30	1.55
	33.66±0.76								1.56±0.02
1879	40.82	474	14	0	2	0	1.25	3.27	1.57
	39.26	469	13	0	2	0	1.27	3.10	1.53
	38.94	546	16	3	0	0	1.16	3.36	1.53
	39.67±1.01								1.54±0.02
2093	19.64	551	7	2	0	0	1.22	1.61	1.49
	16.85	526	7	1	0	0	1.13	1.50	1.52
	15.50	637	6	2	0	0	1.25	1.24	1.51
	17.33±2.11								1.51±0.02

FA pacijenti-pacijenti oboleli od Fankonijeve anemije; MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procent binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

Tabela 4.11. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod BMF pacijenata nakon tretmana DEB-om

BMF pacijenti	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
1850	33.09	680	9	4	2	0	1.53	2.16	1.61
	32.63	600	8	3	2	0	1.54	2.12	1.59
	32.21	669	8	4	2	0	1.57	2.05	1.59
	32.64±0.44								1.60±0.01
1990	29.88	489	11	2	0	0	1.15	2.59	1.63
	28.63	510	13	1	0	0	1.07	2.67	1.62
	27.21	574	12	2	0	0	1.14	2.38	1.64
	28.57±1.34								1.63±0.01
2068	34.43	620	16	3	0	0	1.16	2.97	1.57
	38.18	531	17	2	0	0	1.11	3.45	1.61
	30.35	577	14	2	0	0	1.13	2.70	1.56
	34.32±3.92								1.58±0.03
2083	47.93	582	17	6	0	0	1.26	3.80	1.60
	44.64	540	15	5	0	0	1.25	3.57	1.58
	45.60	591	18	5	0	0	1.22	3.75	1.56
	46.06±1.69								1.58±0.02
3370	36.96	499	13	0	2	0	1.27	2.92	1.58
	35.93	487	12	0	2	0	1.29	2.79	1.54
	34.48	506	14	2	0	0	1.13	3.07	1.54
	35.79±1.25								1.55±0.02

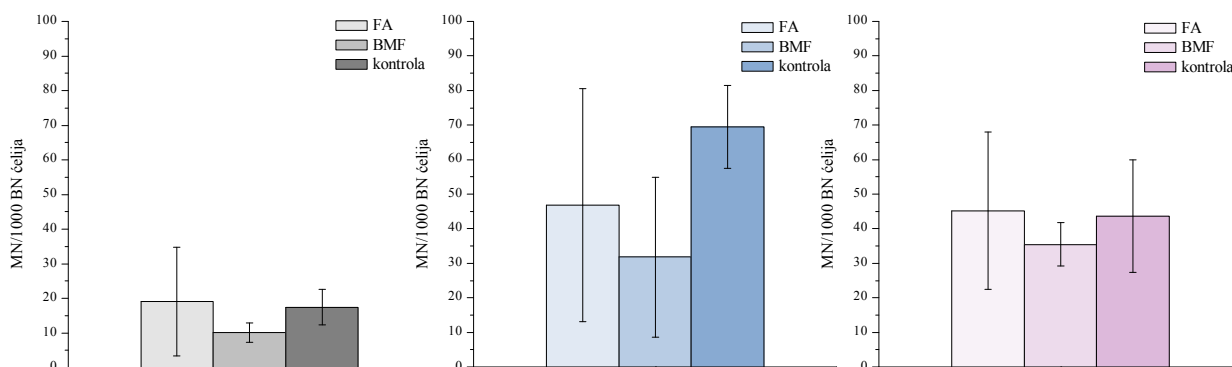
BMF pacijenti-pacijenti oboleli od aplazije kostne srži; MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procent binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks

U BMF grupi nije bilo značajnih razlika u učestalosti MN (Tabela 4.11.) u odnosu na kontrolne uzorke nakon tretmana DEB-om (Tabela 4.12.). Proliferativni potencijal je smanjen kod svih osim kod 1850 i 1990 kod koga je uočeno značajno povećanje ($t=2.26$, $p<0.01$) u odnosu na kontrolne uzorke.

Tabela 4.12. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnoj grupi nakon tretmana DEB-om

Kontrolna grupa	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN					MN/mBN ćeliji	% mBN ćelija	PRI
		0	1	2	3	4			
Kontrola 1	14.63	540	6	1	0	0	1.14	1.28	1.62
	13.78	502	5	1	0	0	1.17	1.18	1.62
	12.87	537	7	0	0	0	1.00	1.29	1.59
	13.76±0.88								1.61±0.02
Kontrola 2	57.14	532	25	2	1	0	1.14	5.00	1.59
	49.84	595	24	2	1	0	1.15	4.34	1.61
	55.45	514	24	3	0	0	1.11	4.99	1.61
	54.14±3.82								1.60±0.01
Kontrola 3	46.04	522	17	4	0	0	1.19	3.87	1.59
	45.20	510	18	3	0	0	1.14	3.95	1.61
	42.81	564	16	3	1	0	1.25	3.42	1.56
	44.68±1.68								1.59±0.03
Kontrola 4	65.79	505	20	6	1	0	1.30	5.08	1.59
	63.49	540	19	7	1	0	1.33	4.76	1.56
	62.86	500	18	6	1	0	1.32	4.76	1.59
	64.05±1.54								1.58±0.02
Kontrola 5	50.91	530	15	3	1	1	1.40	3.64	1.54
	48.24	517	18	4	0	0	1.18	4.08	1.52
	46.43	539	17	3	1	0	1.24	3.75	1.49
	48.53±2.25								1.52±0.03
Kontrola 6	38.89	521	17	2	0	0	1.11	3.52	1.62
	36.14	643	18	3	0	0	1.14	3.16	1.59
	36.43	530	18	1	0	0	1.05	3.46	1.55
	37.15±1.51								1.59±0.04

MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; MN/mBN ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; % mBN ćelija-procent binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; PRI-proliferativni indeks



Slika 4.1. Učestalost mikronukleusa; bazalna, nakon zračenja i tretmana DEB-om (srednja vrednost ± S.D.)

4.2. Analiza kinetike popravke spontanih i indukovanih dvolančanih prekida

Analizom γ -H2AX fokusa kvantifikovan je broj dvolančanih prekida molekula DNK. Praćena je spontana učestalost dvolanačanih prekida (0 min.) i učestalost prekida 30 min., 2 h, 5 h i 24 h nakon zračenja (γ -zračenje, doza 2 Gy) i tretmana DEB-om kod svih pacijenata i u kontrolnim uzorcima.

Analiza učestalosti dvolančanih prekida pre zračenja i tretmana DEB-om (0 min.) pokazala je značajno veću incidencu u FA i BMF grupi u poređenju sa kontrolom ($t=3.03$, $p<0.05$; $t=2.86$, $p<0.05$).

4.2.1. Analiza dvolančanih prekida (γ -H2AX fokusa) indukovanih zračenjem

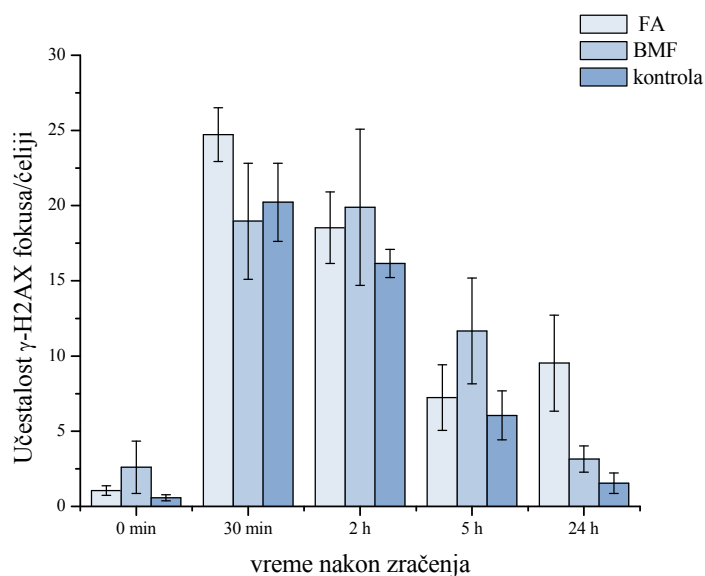
Nakon zračenja, FA fibroblasti pokazuju najveću učestalost zračenjem-indukovanih γ -H2AX fokusa nakon 30 minuta, značajno više u poređenju sa BMF ($t=3.03$, $p<0.05$) i kontrolom ($t=3.26$, $p<0.01$) (Tabela 4.13. i Slika 4.2.).

Tabela 4.13. Učestalost dvolančanih prekida pre i nakon zračenja

	Ćelijska linija	Vreme nakon zračenja				
		0 min.	30 min.	2 h	5 h	24 h
FA grupa	2229	0.80	24.31	19.49	5.04	9.54
	1823	1.05	26.36	15.01	5.50	5.25
	1866	0.83	21.93	18.22	8.29	8.05
	1879	1.01	26.20	21.57	6.96	11.01
	2093	1.60	24.81	18.37	10.41	13.78
	Σ		1.06±0.32	24.72±1.79	18.53±2.38	7.24±2.18
BMF grupa	1850	1.07	19.04	13.62	11.69	4.12
	1990	3.45	12.83	25.11	14.96	2.56
	2068	4.92	19.28	25.45	14.97	3.90
	2083	2.86	23.43	17.30	6.63	2.08
	3370	0.72	20.25	17.97	10.10	3.10
	Σ		2.60±1.74	18.96±3.85	19.89±5.19	11.67±3.52
Kontrolna grupa	1	0.60	20.01	16.50	6.83	1.11
	2	0.40	19.79	14.53	5.23	1.12
	3	0.49	17.89	16.63	7.91	1.90
	4	0.38	23.84	17.01	3.68	1.23
	5	0.76	22.62	15.54	5.15	1.14
	6	0.86	17.16	16.74	7.53	2.80
	Σ		0.58±0.20	20.22±2.60	16.16±0.94	6.05±1.63

Iako se u narednim periodima (2 h i 5 h) uočava trend opadanja broja dvolančanih prekida, 24 h nakon zračenja incidenca je i dalje visoka, značajno viša u poređenju sa BMF ($t=4.31$, $p<0.005$) i kontrolnim ćelijama ($t=6.02$, $p<0.0005$).

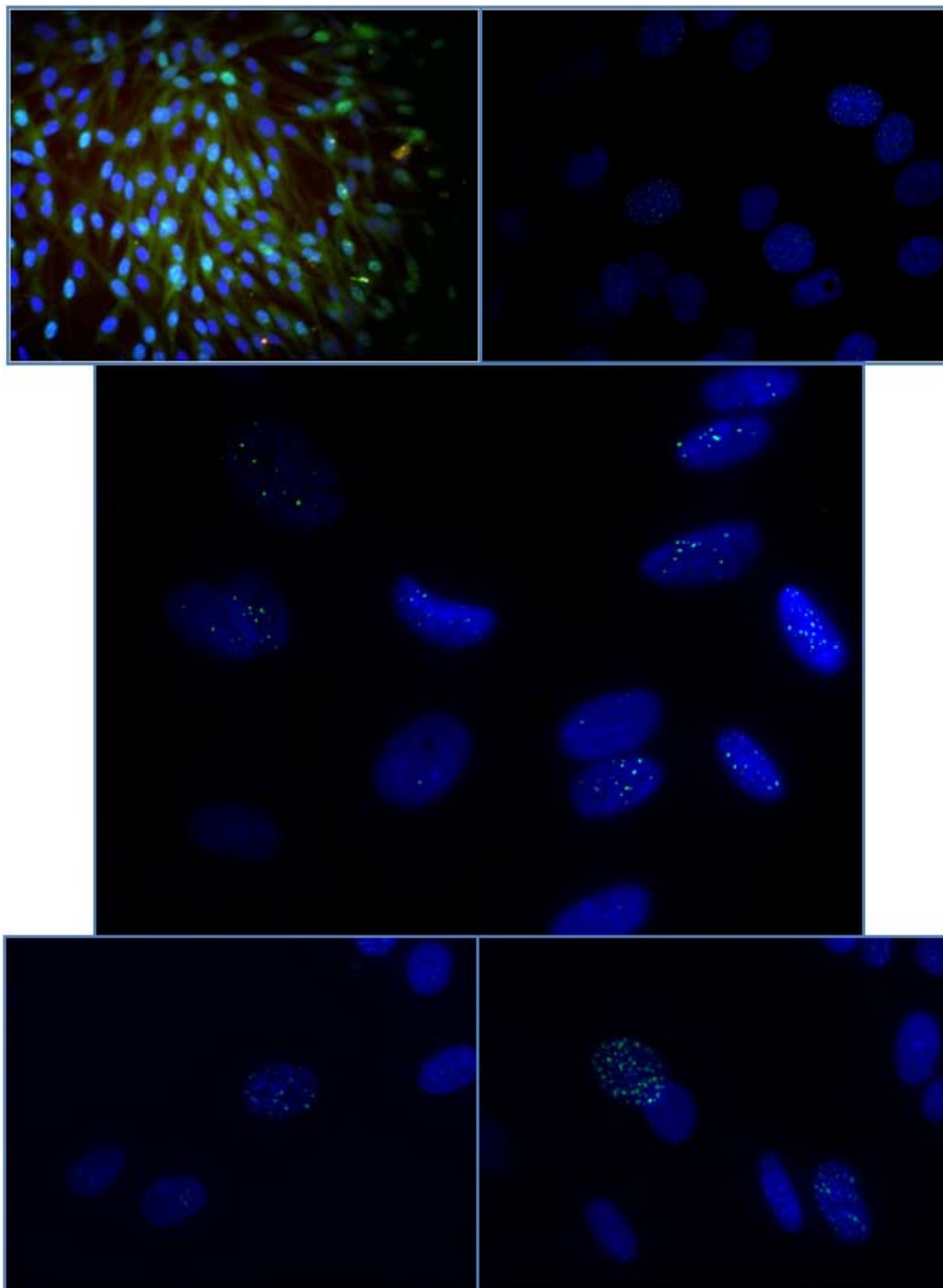
U poređenju sa stanjem pre zračenja, broj nepopravljenih dvolančanih prekida DNK u FA grupi je značajno, 9 puta, veći ($t=5.90$, $p<0.0005$).



Slika 4.2. Učestalost dvolančanih prekida u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja (srednja vrednost \pm S.D.)

U BMF grupi najveći broj dvolančanih prekida uočava se 2 h nakon zračenja (19.89 ± 5.19). Iako broj dvolančanih prekida opada tokom vremena, nakon 5 h je njihov broj i dalje visok, značajno viši u poređenju sa FA ($t=2.39$, $p<0.05$) i kontrolnim ćelijama ($t=3.51$, $p<0.05$). Nakon 24 h broj dvolančanih prekida se značajno smanjuje i u odnosu na stanje pre zračenja nema statistički značajnih razlika.

Na Slici 4.3. prikazane su mikrofografije fibroblasta obeleženih sa γ -H2AX fokusima.



Slika 4.3. Fibroblasti obeleženi anti- γ -H2AX antitelom

4.2.1.1. Analiza γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija i distribucija γ -H2AX fokusa nakon zračenja

Analizom γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija praćena je procentualna zastupljenost ćelija sa γ -H2AX fokusima u sve tri ispitivane grupe (Tabela 4.14. i Slika 4.4.).

Pre zraćenja, 14.16 % ćelija u FA grupi bilo je γ -H2AX fokus-pozitivno i poređenjem sa kontrolnom i BMF grupom nije utvrđena značajna razlika. 24 h nakon zraćenja u FA grupi je utvrđeno čak 57.47 % ćelija sa fokusima, dok je procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija u BMF grupi (41.82 %) i kontrolnoj grupi (32.01 %) značajno niži.

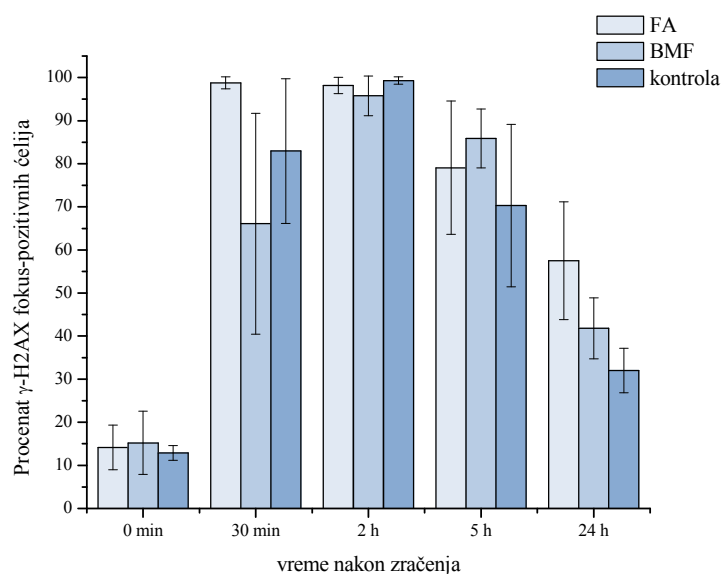
Rezultati statističke analize pokazali su da FA grupu 24 h nakon zraćenja karakteriše značajno viši procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija kada se porede sa kontrolnom ($t=4.25$, $p<0.005$) i BMF grupom ($t=15.65$, $p<0.05$).

Tabela 4.14. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija pre i nakon zraćenja

	Ćelijska linija	0 min.	Vreme nakon zraćenja			
			30 min.	2 h	5 h	24 h
FA grupa	2229	17.74	97.87	95.52	52.61	59.22
	1823	13.12	100	100	92.28	38.82
	1866	6.73	100	97.22	81.34	54.65
	1879	20.22	99.30	98.17	81.54	57.48
	2093	13.00	96.77	100	87.55	77.17
	Σ	14.16 \pm 5.18	98.79 \pm 1.42	98.18 \pm 1.91	79.06 \pm 15.47	57.47 \pm 13.66
BMF grupa	1850	5.78	74.65	88.09	80.99	38.81
	1990	15.24	50.21	99.49	77.78	43.30
	2068	18.26	81.90	99.10	89.66	41.84
	2083	25.32	93.55	96.45	94.98	32.90
	3370	11.50	30.10	95.71	85.83	52.25
Σ	15.22 \pm 7.32	66.08 \pm 25.62	95.77 \pm 4.59	85.85 \pm 6.83	41.82 \pm 7.06	
Kontrolna grupa	1	14.76	56.88	97.96	76.38	33.43
	2	10.17	74.87	100	96.28	27.29
	3	13.78	100	100	38.21	24.85
	4	12.7	100	98.84	73.64	36.27
	5	14.26	89.18	99.14	71.31	38.21
	6	11.81	76.71	98.84	65.89	32.03
	Σ	12.91 \pm 1.72	82.94 \pm 16.76	99.32 \pm 0.84	70.29 \pm 18.83	32.01 \pm 5.14

Takođe, u BMF grupi je utvrđen značajno veći procenat fokus pozitivnih ćelija u poređenju sa kontrolom 24 h nakon zračenja ($t=2.79$, $p<0.05$).

U odnosu na stanje pre zračenja (0 min.), nakon zračenja u sve tri ispitivane grupe na svim vremenima utvrđena je visoko značajna razlika u procentu fokus-pozitivnih ćelija ($p<0.00001$).

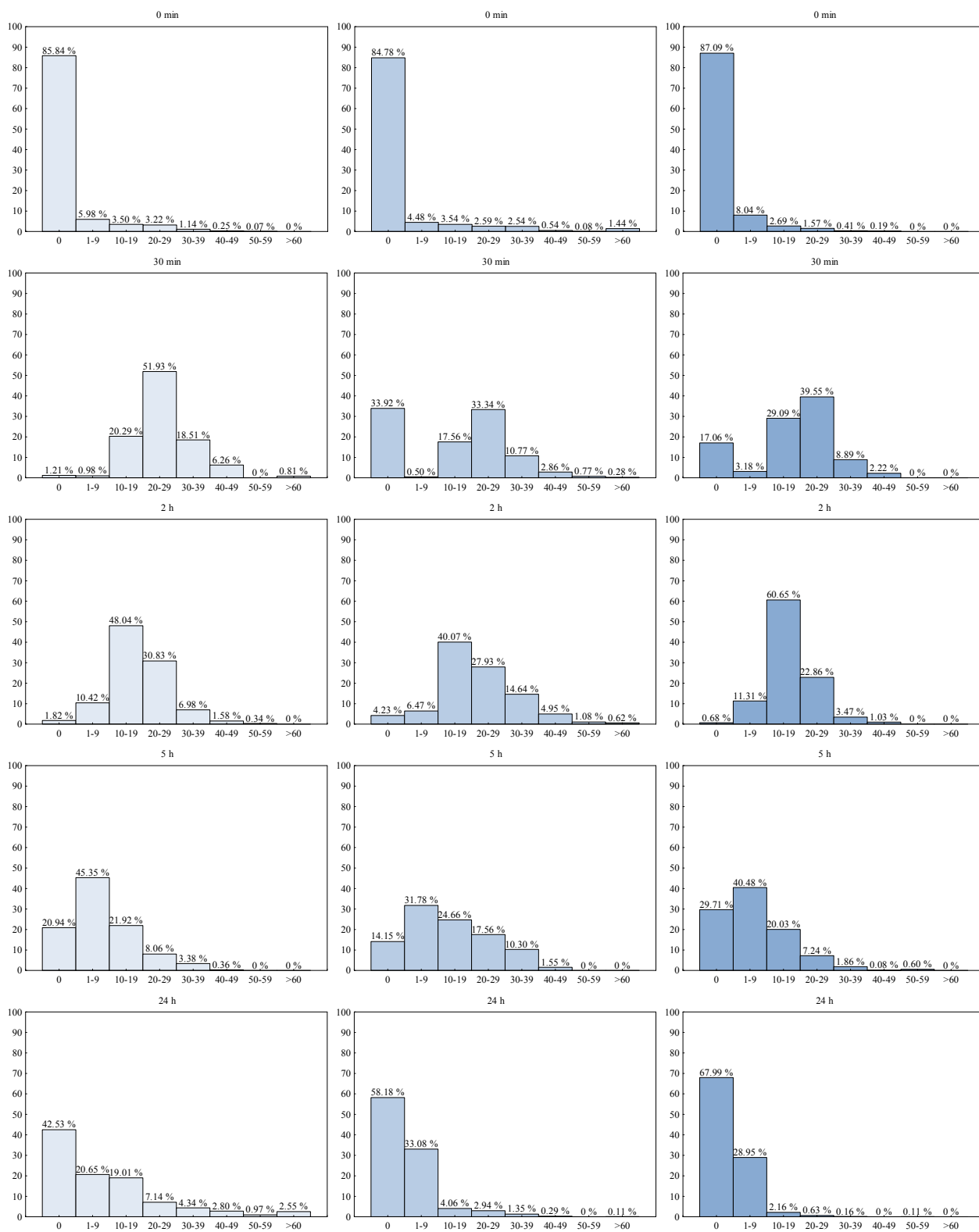


Slika 4.4. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja (srednja vrednost \pm S.D.)

Distribucija broja γ -H2AX fokusa po ćeliji prikazana je na Slici 4.5. Analiza u FA grupi pre zračenja pokazala je da 98.54 % ćelija sadrži reparabilan broj fokusa (0-30), dok 1.46 % ćelija sadrži ≥ 30 prekida po ćeliji. Nakon zračenja procenat ćelija sa ≥ 30 prekida dostiže maksimum na 30 min. (25.58 %), zatim opada tokom narednih 2 h (8.9 %) i 5 h (3.74 %) i 24 h posle dostiže novi maksimum od 10.66 %.

U BMF grupi pre zračenja 95.39 % ćelija je sa 0-30 prekida. Nakon zračenja, procenat ćelija sa nereparabilnim fokusima se povećava, dostiže maksimum na 2 h (21.29 %), zatim opada i nakon 24 h iznosi 1.75 %.

Analiza distribucije fokusa u kontrolnoj grupi, pokazala je znatno manji procenat ćelija sa ≥ 30 prekida u odnosu na obe grupe pacijenta i pre (0.60 %) i nakon zračenja. Najveći procenat od 11.11 % uočava se posle 30 min., dok u narednim periodima procenat ćelija opada i posle 24 h iznosi 0.27 %.



Slika 4.5. Distribucija γ -H2AX foka, pre i nakon zračenja u FA ■ BMF ■ i kontrolnoj grupi ■

4.2.1.2. Analiza učestalosti γ -H2AX fokus-pozitivnih i γ -H2AX fokus-negativnih mikronukleusa nakon zračenja

Praćen je broj mikronukleusa u mononukleusnim fibroblastima u sve tri grupe, pre i nakon zračenja (Tabela 4.15. i Slika 4.6.). Utvrđeni mikronukleusi su zatim klasifikovani u fokus-pozitivne u kojima je detektovano prisustvo γ -H2AX i fokus-negativne, bez detektabilnih γ -H2AX fokusa (Tabela 4.16. i Slika 4.7.).

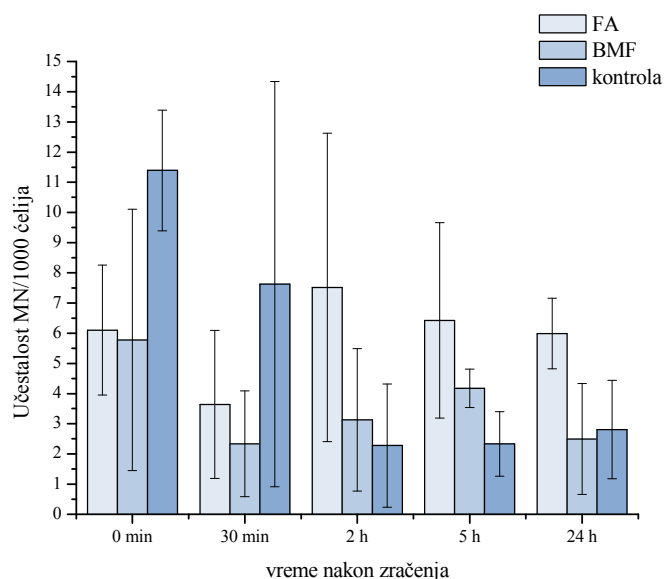
U Tabeli 4.15. prikazan je broj mikronukleusa na 1000 ćelija. U FA grupi, broj ćelija koje sadrže MN je relativno konstantan, kada se poredi vreme pre i nakon zračenja. Uočava se blago smanjenje 30 min. i blago povećanje 2 h i 5 h nakon zračenja, značajno u odnosu na kontrolu ($t=2.40$, $p<0.05$). Poređenjem sa kontrolnom i BMF grupom utvrđeno je značajno više ćelija sa MN u FA grupi 24 h nakon zračenja ($t=3.41$, $p<0.05$; $t=3.58$, $p<0.05$).

Tabela 4.15. Učestalost mikronukleusa pre i nakon zračenja

Ćelijska linija	0 min.		Vreme nakon zračenja									
	br.ćelija/ br. MN	MN	30 min.		2 h		5 h		24 h			
			br.ćelija /br. MN	MN	br.ćelija/ br. MN	MN	br.ćelija /br. MN	MN	br.ćelija /br. MN	MN	br.ćelija/ br. MN	MN
FA grupa	2229	654/6	9.17	576/0	0.00	776/5	6.44	607/7	11.53	674/5	7.42	
	1823	752/3	3.99	681/4	5.87	653/10	15.31	603/4	6.63	732/5	6.83	
	1866	716/3	4.19	670/4	5.97	560/1	1.79	603/4	6.63	665/3	4.51	
	1879	706/5	7.08	624/2	3.21	328/3	9.15	713/3	4.21	570/3	5.26	
	2093	657/4	6.09	633/2	3.16	615/3	4.88	638/2	3.13	845/5	5.92	
Σ		6.10 \pm 2.15		3.64 \pm 2.45		7.51 \pm 5.11		6.43 \pm 3.24		5.99 \pm 1.17		
BMF grupa	1850	750/10	13.33	831/2	2.41	730/2	2.74	665/3	4.51	708/2	2.82	
	1990	686/3	4.37	658/0	0.00	666/4	6.01	719/3	4.17	643/3	4.67	
	2068	969/3	3.10	626/2	3.21	604/0	0.00	663/3	4.52	622/0	0.00	
	2083	695/2	2.89	696/1	1.44	621/3	4.83	651/2	3.07	714/1	1.40	
	3370	576/3	5.21	649/3	4.62	485/1	2.06	870/4	4.59	556/2	3.60	
Σ		5.78 \pm 4.33		2.34 \pm 1.75		3.13 \pm 2.36		4.17 \pm 0.64		2.50 \pm 1.84		
Kontrolna grupa	3	699/10	14.31	649/1	1.54	623/3	4.82	603/2	3.32	812/3	3.69	
	4	715/7	9.79	697/12	17.22	667/1	1.50	628/2	3.18	656/1	1.52	
	5	644/7	10.87	700/4	5.71	713/2	2.81	708/1	1.41	732/1	1.37	
	6	755/8	10.60	661/4	6.05	720/0	0.00	722/1	1.39	642/3	4.67	
	Σ		11.39 \pm 2.00		7.63 \pm 6.71		2.28 \pm 2.04		2.33 \pm 1.07		2.81 \pm 1.63	

MN-broj mikronukleusa na 1000 mononukleusnih ćelija

U BMF grupi broj MN pokazuje blago opadanje 30 min. i 2 h nakon zračenja, na 5 h se uočava značajno povećanje u poređenju sa kontrolom ($t=3.24$, $p<0.05$), dok se nakon 24 h broj MN smanjuje i dostiže sličnu vrednost kao u kontrolnoj grupi.



Slika 4.6. Učestalost mikronukleusa u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja (srednja vrednost \pm S.D.)

U cilju praćenja dvostranih prekida, nastali MN su podeljeni u dve grupe, γ -H2AX fokus-pozitivne, koji ih sadrže i γ -H2AX fokus-negativne, bez njih (Slika 4.7.).

U FA grupi utvrđen je najveći broj fokus-pozitivnih MN pre zračenja i u svim periodima nakon zračenja. Takođe, odnos fokus-pozitivnih i fokus-negativnih MN je relativno ujednačen na svim ispitivanim vremenima.

Poređenjem sa kontrolnim ćelijama u FA grupi je utvrđeno značajno više γ -H2AX fokus-pozitivnih mikronukleusa, 2 h, 5 h i 24 h nakon zračenja ($t=3.67$, $p<0.05$; $t=2.68$, $p<0.01$; $t=3.98$, $p<0.05$) i značajno manje fokus-negativnih pre zračenja ($t=-7.89$, $p<0.00001$). Poređenjem sa BMF grupom, utvrđeno je značajno više fokus-pozitivnih MN u FA grupi, 2 h i 5 h nakon zračenja ($t=3.73$, $p<0.05$; $t=2.59$, $p<0.01$) i visoko značajno više fokus-negativnih MN ($t=5.87$, $p<0.001$).

U BMF grupi uočava se dvostruko veći broj fokus-negativnih MN u odnosu na fokus-pozitivne, dok je ukupan broj MN manji nego u FA grupi.

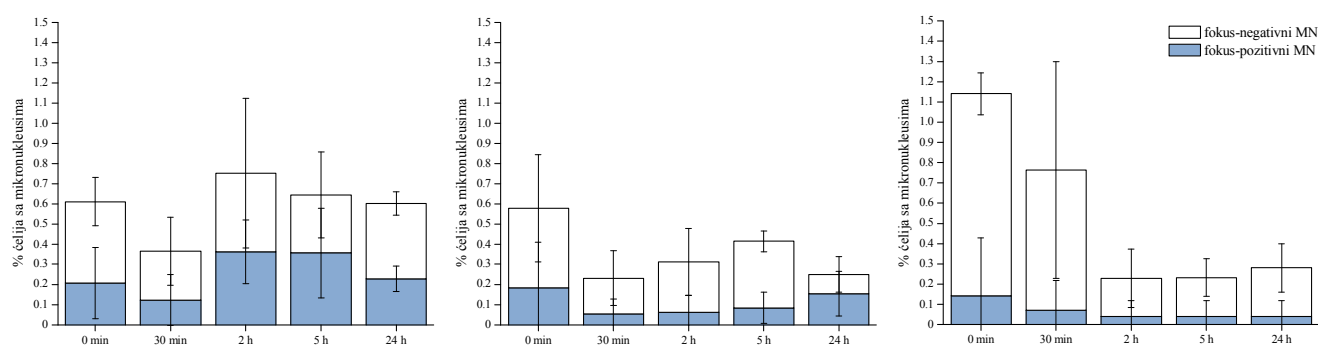
Poređenjem BMF grupe sa kontrolnom nije utvrđena značajna razlika fokus-pozitivnih MN, dok je pre zračenja, kao i kod FA grupe i u BMF grupi značajno manji broj MN u odnosu na kontrolu ($t=-4.23$, $p<0.01$). U BMF grupi utvrđeno je i značajno više fokus-negativnih MN 5 h nakon zračenja ($t=2.86$, $p<0.01$).

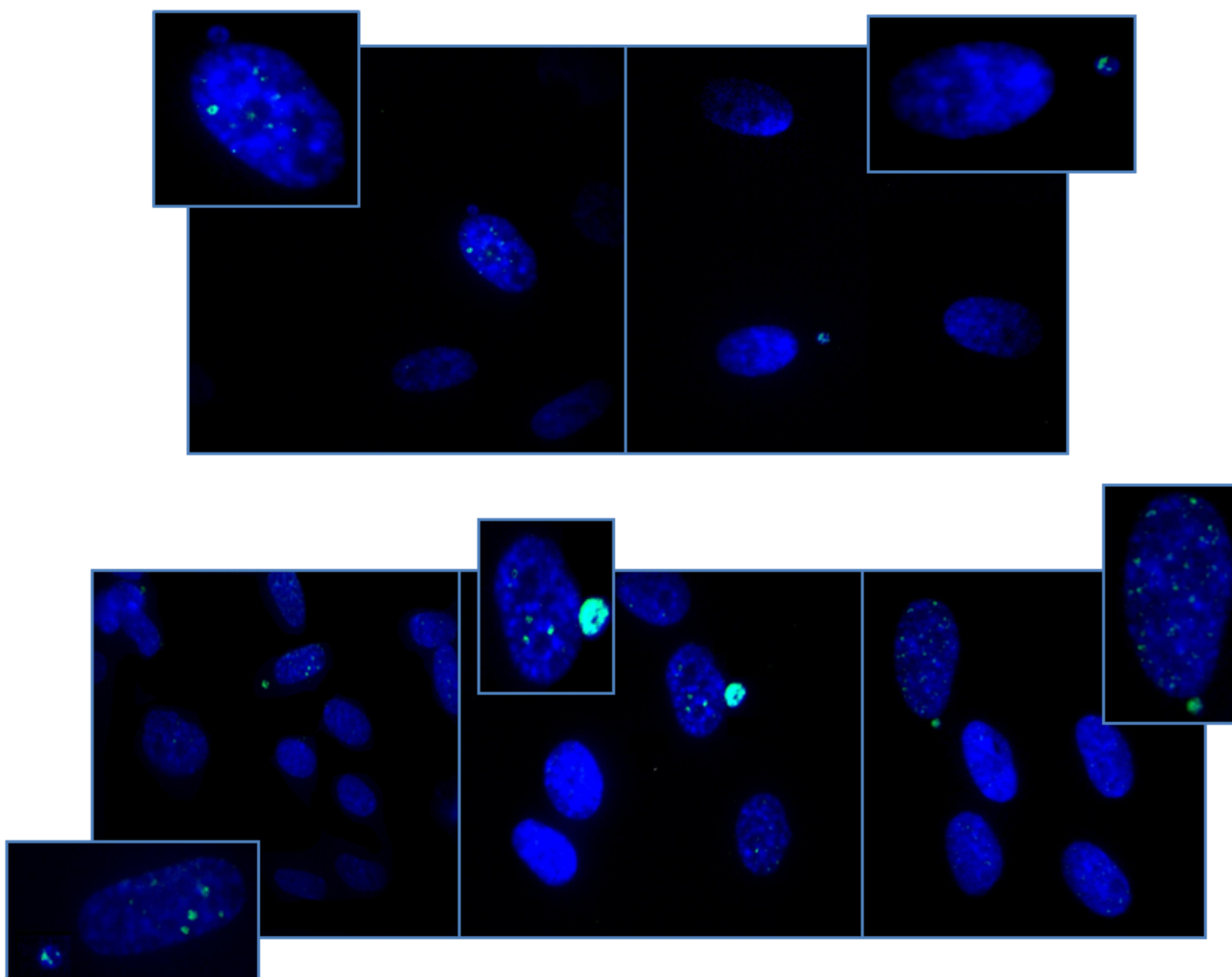
Tabela 4.16. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih i γ -H2AX fokus-negativnih mikronukleusa pre i nakon zračenja

Ćelijska linija	Vreme nakon zračenja										
	0 min.		30 min.		2 h		5 h		24 h		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
FA grupa	2229	0.46	0.46	0.00	0.00	0.39	0.26	0.66	0.49	0.30	0.45
	1823	0.00	0.40	0.15	0.44	0.61	0.92	0.17	0.50	0.27	0.41
	1866	0.14	0.28	0.30	0.30	0.18	0.00	0.50	0.17	0.15	0.30
	1879	0.14	0.57	0.00	0.32	0.30	0.61	0.14	0.28	0.18	0.35
	2093	0.30	0.30	0.16	0.16	0.33	0.16	0.31	0.00	0.24	0.36
Σ	0.21 ± 0.18	0.40 ± 0.12	0.12 ± 0.13	0.24 ± 0.17	0.36 ± 0.16	0.39 ± 0.37	0.36 ± 0.22	0.29 ± 0.21	0.23 ± 0.06	0.37 ± 0.06	
BMF grupa	1850	0.53	0.80	0.12	0.12	0.00	0.27	0.15	0.30	0.14	0.14
	1990	0.29	0.15	0.00	0.00	0.15	0.45	0.00	0.42	0.31	0.16
	2068	0.10	0.21	0.00	0.32	0.00	0.00	0.15	0.30	0.00	0.00
	2083	0.00	0.29	0.00	0.14	0.16	0.32	0.00	0.31	0.14	0.00
	3370	0.00	0.52	0.15	0.31	0.00	0.21	0.12	0.32	0.18	0.18
Σ	0.18 ± 0.23	0.39 ± 0.27	0.05 ± 0.07	0.18 ± 0.14	0.06 ± 0.08	0.25 ± 0.17	0.08 ± 0.08	0.33 ± 0.05	0.15 ± 0.11	0.10 ± 0.09	
Kont. grupa	3	0.57	0.86	0.00	0.15	0.16	0.32	0.00	0.33	0.00	0.37
	4	0.00	0.98	0.29	1.43	0.00	0.15	0.16	0.16	0.00	0.15
	5	0.00	1.09	0.00	0.57	0.00	0.28	0.00	0.14	0.00	0.14
	6	0.00	1.06	0.00	0.61	0.00	0.00	0.00	0.14	0.16	0.31
Σ	0.14 ± 0.29	1.00 ± 0.10	0.07 ± 0.15	0.69 ± 0.54	0.04 ± 0.08	0.19 ± 0.14	0.04 ± 0.08	0.19 ± 0.09	0.04 ± 0.08	0.24 ± 0.12	

Kontrolnu grupu karakteriše visok broj spontano nastalih fokus-negativnih MN. Nakon zračenja u kontrolnim fibroblastima uočava se mali broj fokus-pozitivnih MN, dok je broj fokus-negativnih MN oko 4-6 puta veći.

Na Slici 4.8. prikazane su mikrografije mononuklusnih ćelija sa mikronukleusima obeleženim sa γ -H2AX fokusima i mikronukleusima bez γ -H2AX fokusa.

**Slika 4.7.** Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih i γ -H2AX fokus-negativnih mikronukleusa u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja (srednja vrednost \pm S.D.)



Slika 4.8. Mononukleusni fibroblasti sa mikronukleusima

4.2.2. Analiza dvolančanih prekida (γ -H2AX fokusa) indukovanih DEB-om

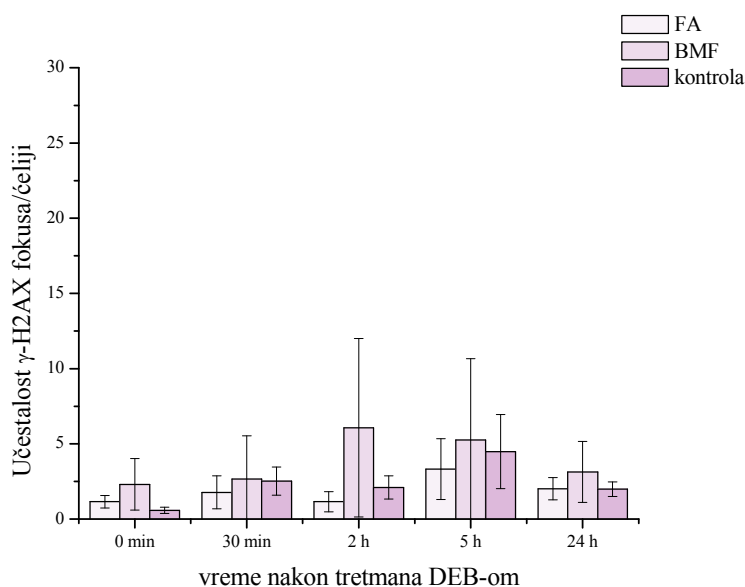
Analiza učestalosti γ -H2AX fokusa nakon tretmana DEB-om nije pokazala značajne razlike između ispitivanih grupa (Tabela 4.17. i Slika 4.9.).

U FA grupi najveća učestalost DEB-indukovanih γ -H2AX fokusa utvrđena je 5 h nakon tretmana (2.71 ± 1.66), kao i u kontrolnoj grupi (4.48 ± 2.46), dok je u BMF grupi najveći broj fokusa uočen 2 h nakon tretmana (6.99 ± 6.13), bez statističkog značaja.

Tabela 4.17. Učestalost dvolančanih prekida pre i nakon tretmana DEB-om

	Ćelijska linija	Vreme nakon tretmana DEB-om				
		0 min.	30 min.	2 h	5 h	24 h
FA grupa	2229	0.80	0.81	1.21	3.51	1.42
	1823	1.05	1.54	0.45	1.21	1.79
	1866	0.83	0.91	1.44	1.56	1.91
	1879	1.01	1.31	0.76	2.04	2.15
	2093	1.60	2.97	1.79	5.24	2.84
	Σ	1.06±0.32	1.51±0.87	1.13±0.53	2.71±1.66	2.02±0.53
BMF grupa	1850	1.07	0.38	6.31	0.79	2.35
	1990	3.45	6.84	13.77	12.53	5.52
	2068	4.92	5.86	12.78	11.73	5.91
	2083	2.86	1.04	0.87	1.48	1.72
	3370	0.72	0.86	1.24	3.49	1.39
	Σ	2.60±1.74	3.00±3.09	6.99±6.13	6.00±5.69	3.38±2.17
Kontrolna grupa	1	0.60	1.50	1.37	1.61	1.49
	2	0.40	2.81	2.33	5.67	1.91
	3	0.49	1.51	1.31	1.57	1.47
	4	0.38	3.97	1.87	7.72	2.44
	5	0.76	2.59	3.42	4.55	2.68
	6	0.86	2.73	2.31	5.76	1.93
	Σ	0.58±0.20	2.52±0.93	2.10±0.78	4.48±2.46	1.99±0.49

U odnosu na stanje pre tretmana DEB-om, 24 h nakon tretmana učestalost dvolančanih prekida je viši u obe grupe pacijenata, značajno u FA grupi ($t=8.02$, $p<0.01$).



Slika 4.9. Učestalost dvolančanih prekida u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om (srednja vrednost ± S.D.)

4.2.2.1. Analiza γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija i distribucija γ -H2AX fokusa nakon tretmana DEB-om

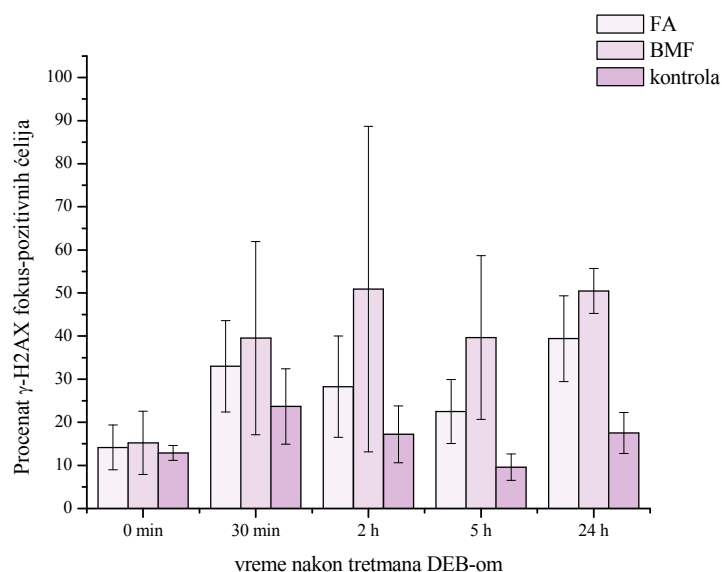
Rezultati analize fokus-pozitivnih ćelija nakon tretmana DEB-om prikazani su u Tabeli 4.18. i na Slici 4.10. U FA i BMF grupi 24 h nakon tretmana DEB-om utvrđeno je značajno više fokus-pozitivnih ćelija u odnosu na kontrolu ($t=4.46$, $p<0.01$; $t=5.41$, $p<0.0005$).

Značajna razlika utvrđena je i između FA i BMF grupe 30 min. nakon zračenja ($t=2.47$, $p<0.01$) i tretmana DEB-om ($t=3.50$, $p<0.01$).

U odnosu na procenat fokus-pozitivnih ćelija pre tretmana, značajne razlike su utvrđene u sve tri grupe 24 h nakon tretmana DEB-om; FA ($t=4.03$, $p<0.02$), BMF ($t=5.00$, $p<0.01$) i kontrolnoj ($t=4.50$, $p<0.01$).

Tabela 4.18. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija pre i nakon tretmana DEB-om

	Ćelijska linija	Vreme nakon tretmana DEB-om				
		0 min.	30 min.	2 h	5 h	24 h
FA grupa	2229	17.74	28.00	23.59	11.89	26.12
	1823	13.12	21.46	13.35	31.80	51.18
	1866	6.73	50.29	45.75	26.41	46.48
	1879	20.22	40.29	28.26	22.48	39.41
	2093	13.00	32.28	30.35	19.95	33.91
	Σ	14.16 \pm 5.18	33.01 \pm 10.61	28.26 \pm 11.77	22.51 \pm 7.43	39.42 \pm 9.94
BMF grupa	1850	5.78	9.49	87.23	15.19	55.29
	1990	15.24	69.57	90.00	64.18	45.66
	2068	18.26	48.26	50.53	47.73	53.35
	2083	25.32	41.82	9.02	44.19	54.12
	3370	11.50	28.50	17.73	27.09	43.97
	Σ	15.22 \pm 7.32	39.53 \pm 22.40	50.90 \pm 37.76	39.68 \pm 19.00	50.48 \pm 5.25
Kontrolna grupa	1	14.76	20.31	16.43	8.82	25.23
	2	10.17	37.58	9.72	14.55	15.93
	3	13.78	22.27	25.51	5.39	10.46
	4	12.70	14.55	9.83	8.11	18.42
	5	14.26	30.52	23.01	9.82	17.61
	6	11.81	16.87	18.81	10.84	17.49
Σ	12.91 \pm 1.72	23.68 \pm 8.75	17.22 \pm 6.58	9.59 \pm 3.05	17.52 \pm 4.75	



Slika 4.10. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om (srednja vrednost \pm S.D.)

Distribucija broja γ -H2AX fokusa po ćeliji nakon tretmana DEB-om prikazana je na Slici 4.11.

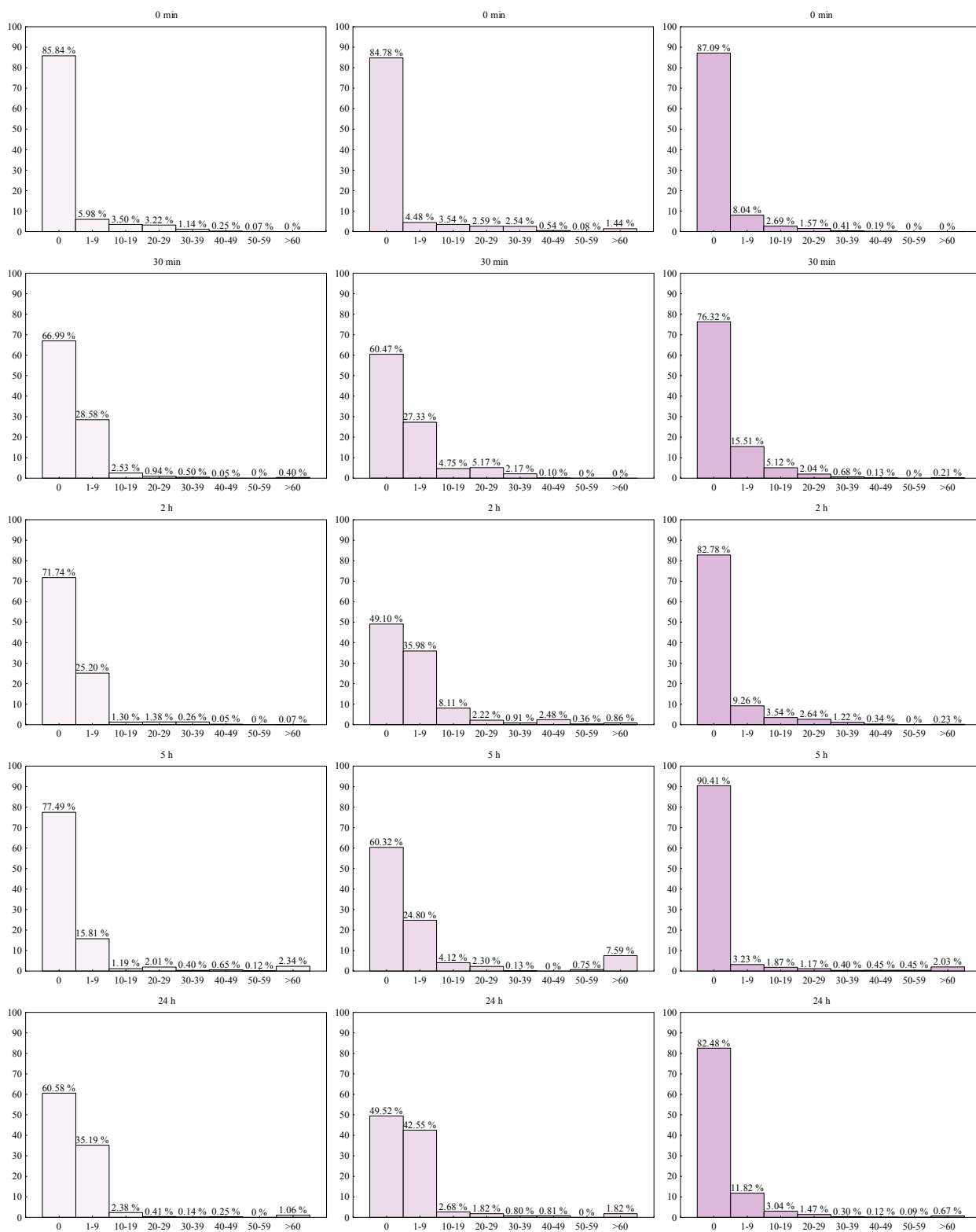
Pre tretmana DEB-om procenat ćelija sa reparabilnim brojem fokusa (0-30) je iznosio; u FA grupi 98.54 % ćelija, u BMF grupi 95.39 % ćelija, dok je u kontroli čak 99.40 % ćelija imalo ≤ 30 fokusa po ćeliji.

Analiza u FA grupi nakon tretmana DEB-om pokazala je da svega 0.95 % ćelija sadrži ≥ 30 prekida posle 30 min., procenat ćelija sa ≥ 30 prekida dostiže maksimum na 5 h (3.51 %), a zatim opada nakon 24 h i iznosi 1.45 %.

U poređenju sa FA grupom, u BMF grupi se uočava veći broj nereparabilnih prekida po ćeliji u svim periodima nakon tretmana DEB-om. Najviši procenat ćelija sa nereparabilnim fokusima se uočava posle 5 h (8.47 %), dok nakon 24 h iznosi 3.43 %.

Analiza distribucije γ -H2AX fokusa u kontrolnoj grupi, pokazala je konstantan broj nereparabilnih ćelija (1-2 %), osim na 5 h gde je utvrđeno 3.33 % ćelija sa ≥ 30 prekida.

U sve tri grupe, na svim vremenima posle tretmana DEB-om, distribucija sledi Poasonovu raspodelu.



Slika 4.11. Distribucija γ -H2AX fokusa pre i nakon tretmana DEB-om u FA BMF i kontrolnoj grupi

4.3. Čelijski ciklus i nivoi spontane i indukovane apoptoze

Metodom protočne citometrije praćen je čelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi pre (0 min.) i nakon zračenja i tretmana DEB-om u istim vremenskim periodima (30 min., 2 h, 5 h i 24 h) paralelno u sve tri grupe, FA, BMF i kontrolnoj.

4.3.1. Analiza čelijskog ciklusa i apoptoze nakon zračenja

Analiza čelijskog ciklusa FA čelijskih linija pokazala je poteškoće u napredovanju kroz čelijski ciklus. U poređenju sa kontrolnim ćelijama značajan deo ćelija se zaustavlja u G2/M fazi pre zračenja (0 min.), dok se nakon zračenja većina ćelija trajno zaustavlja u G2/M, značajno više nakon 5 h ($t=2.98$, $p<0.05$) i 24 h ($t=2.26$, $p<0.05$), što je praćeno malim procentom ćelija koje ulaze u apoptozu (Tabela 4.19. i Slika 4.12.).

Analiza apoptotskog odgovora pokazala je da FA ćelije pokazuju značajnu razliku u poređenju sa kontrolom samo 30 minuta nakon zračenja ($t=-2.38$, $p<0.05$), dok na svim drugim ispitivanim vremenima oporavka nema značajnih razlika između grupa.

U FA grupi pre zračenja, linearnom regresionom analizom utvrđena je negativna korelacija procenta ćelija u G2/M fazi sa ćelijama u G0/G1 ($r=-0.97$, $p<0.01$), S i ćelijama koje su u apoptozi (na granici statističke značajnosti, $r=-0.85$, $p=0.07$).

Nakon zračenja, u FA grupi se uočava isti trend; procenat ćelija u G2/M fazi negativno koreliše sa procentom ćelija u G0/G1, i to visoko značajno 30 min. ($r=-0.95$, $p<0.05$) i 2 h ($r=-0.96$, $p<0.01$) nakon zračenja. Nakon 5 h korelacija je negativna, ali na granici statističke značajnosti ($r=-0.86$, $p=0.06$). Čelije u G2/M značajno negativno korelišu i sa ćelijama u S fazi i apoptozi i to 5 h ($r=-0.91$, $p<0.05$) i 24 h ($r=-0.92$, $p<0.05$) nakon zračenja. Korelacija između procenta ćelija u S fazi i procenta ćelija u apoptozi je takođe negativna i značajna 24 h posle zračenja ($r=-0.92$, $p<0.05$).

Poređenjem FA grupe sa BMF grupom pre i nakon zračenja utvrđena je značajna razlika 5 h nakon zračenja u G0/G1 fazi ($t=-2.84$, $p<0.05$) ćelijskog ciklusa, dok na svim drugim ispitivanim vremenima oporavka nema značajnih razlika između grupa.

Tabela 4.19. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA grupi pre i nakon zračenja

Faza ćelijskog ciklusa	Vreme nakon zračenja	FA pacijenti					Σ
		2229	1823	1866	1879	2093	
G0/G1	0 min.	26.21	24.64	31.95	35.91	15.78	26.90±7.68
	30 min.	22.67	1.96	28.44	42.27	1.09	19.29±17.71
	2 h	26.02	28.11	0.48	31.27	3.26	17.83±14.72
	5 h	18.59	10.04	5.02	21.66	1.47	11.36±8.63
	24 h	11.31	11.95	7.56	18.00	14.85	12.73±3.92
S	0 min.	30.56	39.26	41.29	32.57	27.87	34.31±5.74
	30 min.	43.89	30.00	52.84	21.07	14.75	32.51±15.78
	2 h	27.68	43.07	14.10	18.22	33.04	27.22±11.60
	5 h	49.73	39.38	60.79	45.06	41.08	47.21±8.58
	24 h	20.32	5.10	50.08	47.40	26.97	29.97±18.90
G2/M	0 min.	26.63	25.78	14.01	12.27	52.79	26.30±16.20
	30 min.	19.62	68.15	15.19	7.21	83.47	38.73±34.57
	2 h	7.62	22.66	84.80	5.82	60.87	36.35±34.98
	5 h	6.59	48.82	34.12	15.88	55.26	32.13±20.82
	24 h	6.01	0.13	39.83	29.4	46.34	24.34±20.44
AP	0 min.	17.70	10.99	13.79	19.66	3.74	13.18±6.26
	30 min.	15.00	0.56	4.55	30.14	0.68	10.19±12.16
	2 h	39.68	6.90	0.90	45.68	2.83	19.20±21.65
	5 h	26.09	2.51	0.88	17.27	2.20	9.79±11.31
	24 h	63.13	81.87	3.03	3.46	13.02	32.90±36.97

U BMF grupi sve ćelije su u S fazi ćelijskog ciklusa pre zračenja, dok u svim periodima posle zračenja visok broj ćelija umire putem apoptoze, što je praćeno padom broja ćelija u S fazi (Tabela 4.20. i Slika 4.12.). Korelacionom analizom utvrđena je negativna korelacija između broja ćelija u S fazi i apoptozi, kako pre tako i u svim periodima nakon zračenja ($r=-0.97$, $p<0.01$).

Linearnom regresionom analizom utvrđeno je da procenat ćelija koje se nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa pre zračenja (0 min.) koreliše negativno, statistički značajno sa procentom ćelija u G0/G1 ($r=-0.96$, $p<0.01$) i procentom ćelija koje su ušle u apoptozu ($r=-0.90$, $p<0.05$).

Procenat ćelija u G2/M fazi koreliše negativno, statistički značajno sa procentom ćelija u S fazi ($r=-0.95$, $p<0.01$) i pozitivno sa procentom ćelija u apoptozi ($r=0.98$, $p<0.005$), 30 minuta nakon zračenja. Procenat ćelija koje se nalaze u S fazi, 30 min., 2 h i 5 h nakon zračenja i dalje negativno koreliše sa procentom ćelija koje ulaze u apoptozu ($r=-0.91$, $p=0.03$; $r=-0.97$, $p<0.001$; $r=-0.89$, $p<0.05$). Značajna negativna korelacija utvrđena je između procenta ćelija u G2/M fazi i ćelija u apoptozi, 5 h nakon zračenja ($r=-0.92$, $p<0.05$).

Tabela 4.20. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u BMF grupi pre i nakon zračenja

Faza ćelijskog ciklusa	Vreme nakon zračenja	BMF pacijenti					Σ
		1850	1990	2068	2083	3370	
G0/G1	0 min.	22.66	28.14	19.13	12.20	23.26	21.08±5.91
	30 min.	19.00	11.32	12.16	14.32	18.34	15.03±3.51
	2 h	19.80	36.31	15.68	25.89	24.63	24.46±7.77
	5 h	33.02	18.74	21.74	21.53	27.41	24.49±5.72
	24 h	9.24	16.99	16.69	14.77	16.65	14.87±3.27
S	0 min.	33.80	32.60	40.42	50.28	36.84	38.79±7.10
	30 min.	49.44	38.60	48.31	63.23	49.77	49.87±8.78
	2 h	36.26	11.74	20.56	44.57	29.63	28.55±12.88
	5 h	24.15	47.39	35.99	31.65	41.11	36.06±8.88
	24 h	10.08	36.73	27.62	21.73	26.39	24.51±9.73
G2/M	0 min.	26.97	27.62	29.12	28.73	26.03	27.69±1.27
	30 min.	28.84	44.52	34.79	21.17	29.55	31.77±8.62
	2 h	21.56	2.44	13.36	11.62	14.75	12.75±6.88
	5 h	1.60	28.33	28.33	7.07	11.01	15.27±12.38
	24 h	2.52	20.02	15.30	8.18	10.45	11.29±6.70
AP	0 min.	17.11	14.20	12.21	9.24	13.73	13.30±2.88
	30 min.	3.03	6.90	4.89	2.09	4.26	4.23±1.84
	2 h	23.20	54.12	51.89	18.26	31.65	35.82±16.42
	5 h	41.62	7.52	14.34	39.66	20.35	24.70±15.26
	24 h	78.15	28.24	41.25	54.84	46.12	49.72±18.58

Korelaciona analiza je pokazala da su 24 h nakon zračenja, ćelije u G0/G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa značajno negativno korelisane po broju, sa ćelijama u apoptozi ($r=-0.94$, $p<0.05$; $r=-0.99$, $p<0.0003$; $r=-0.97$, $p<0.01$). Nasuprot tome, procenat ćelija u G0/G1 fazi i G2/M fazi pozitivno koreliše sa procentom ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa ($r=0.92$, $p<0.05$; $r=0.97$, $p<0.01$).

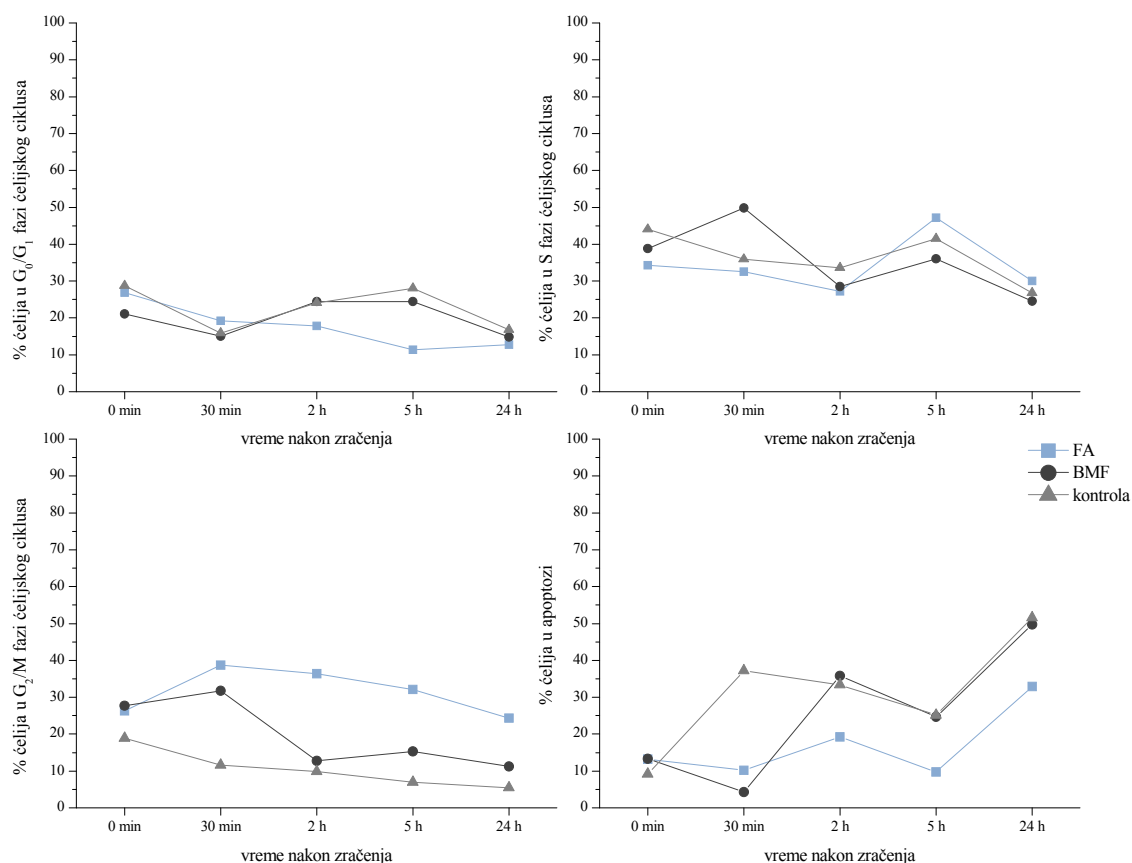
Posmatrajući ceo period oporavka nakon zračenja većina ozračenih kontrolnih ćelija su u S fazi ćelijskog ciklusa (Tabela 4.21. i Slika 4.12.) i taj broj koreliše negativno sa brojem ćelija koje umiru apoptozom ($r=-0.95$, $p<0.05$). Negativna korelacija utvrđena je takođe i između ćelija koje se nalaze u G2/M fazi i ćelija koje su podlegle apoptozi, pre i u svim periodima nakon zračenja, i ona je bila značajna 30 min. ($r=-0.95$, $p<0.005$) i 5 h nakon zračenja ($r=-0.94$, $p<0.005$).

Tabela 4.21. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja

Faza ćelijskog ciklusa	Vreme nakon zračenja	Kontrolna grupa						Σ
		1	2	3	4	5	6	
G0/G1	0 min.	23.50	30.14	32.00	19.40	35.25	32.01	28.72±6.01
	30 min.	14.69	12.17	7.51	17.87	12.22	30.74	15.87±8.04
	2 h	22.91	22.79	18.15	28.20	25.92	26.57	24.09±3.60
	5 h	23.96	25.32	49.22	21.97	16.47	31.38	28.05±11.44
	24 h	14.45	14.73	16.50	23.02	9.90	22.24	16.81±5.02
S	0 min.	49.21	39.60	35.63	63.53	34.73	41.31	44.00±10.87
	30 min.	39.02	36.47	24.94	61.91	20.44	33.00	35.96±14.52
	2 h	38.44	35.07	18.21	50.31	22.06	37.72	33.63±11.76
	5 h	45.40	39.31	22.48	27.27	72.12	42.03	41.44±17.45
	24 h	29.14	21.22	23.75	46.14	3.89	36.36	26.75±14.40
G2/M	0 min.	17.12	22.78	17.93	16.46	23.92	15.36	18.93±3.55
	30 min.	12.11	9.87	6.07	16.21	7.67	17.41	11.56±4.57
	2 h	10.03	5.17	5.52	11.26	12.75	14.23	9.83±3.75
	5 h	7.89	5.65	5.97	4.55	9.68	7.92	6.94±1.88
	24 h	8.11	6.14	5.71	8.18	1.03	3.60	5.46±2.76
AP	0 min.	10.21	8.22	16.22	1.34	7.49	11.39	9.14±4.91
	30 min.	34.90	41.80	62.25	4.94	60.32	19.28	37.25±22.58
	2 h	28.97	37.16	60.11	11.89	40.76	21.65	33.42±16.75
	5 h	23.14	30.27	26.10	48.48	3.83	19.16	25.16±14.60
	24 h	46.91	58.02	55.65	24.22	86.08	38.17	51.51±20.97

Procenat ćelija koje se nalaze u G0/G1 fazi koreliše pozitivno sa procentom ćelija u G2/M, i to značajno 30 min. nakon zračenja ($r=0.88$, $p<0.05$) i negativno sa procentom ćelija u apoptozi, značajno 2 h ($r=-0.87$, $p<0.05$) i 24 h ($r=-0.92$, $p<0.01$) nakon zračenja. Značajna pozitivna korelacija procenta ćelija u G0/G1 fazi sa ćelijama u S fazi utvrđena je 24 h nakon zračenja ($r=0.88$, $p<0.05$).

Procenat ćelija koje se nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa koreliše pozitivno sa procentom ćelija u G₂/M fazi, i to značajno 5 h ($r=0.87$, $p<0.05$) nakon zračenja i negativno sa procentom ćelija u apoptozi, značajno 30 min., 2 h i 24 h nakon zračenja ($r=-0.87$, $p<0.05$; $r=-0.93$, $p<0.01$; $r=-0.99$, $p<0.0001$).



Slika 4.12. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja

4.3.2. Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze nakon tretmana DEB-om

Analiza ćelijskog ciklusa nakon tretmana DEB-om u FA grupi pokazala je da su ćelije ravnomerno distribuirane u okviru sve tri faze; G0/G1, S i G2/M (Tabela 4.22. i Slika 4.13.).

Poređenjem sa kontrolnim ćelijama utvrđene su značajne razlike 24 h nakon tretmana u G0/G1 fazi ($t=-2.51$, $p<0.05$) i G2/M fazi ($t=3.19$, $p<0.05$).

Korelacionom analizom utvrđene su negativne korelacije između procenta ćelija u G2/M fazi i procenta ćelija u G0/G1 fazi, S fazi i apoptozi, ali bez statističkog značaja.

Tabela 4.22. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA grupi pre i nakon tretmana DEB-om

Faza ćelijskog ciklusa	Vreme nakon tretmana DEB-om	FA pacijenti					Σ
		2229	1823	1866	1879	2093	
G0/G1	0 min.	26.21	24.64	31.95	35.91	15.78	26.90±7.68
	30 min.	29.08	3.83	32.31	20.76	6.37	18.47±12.94
	2 h	13.37	33.36	0.45	15.41	10.34	14.59±11.96
	5 h	25.83	13.79	26.89	23.74	3.22	18.69±10.09
	24 h	24.09	34.84	11.09	21.94	16.19	21.63±8.96
S	0 min.	30.56	39.26	41.29	32.57	27.87	34.31±5.74
	30 min.	47.53	46.09	39.49	35.74	28.52	39.47±7.79
	2 h	35.03	17.86	54.04	28.11	27.76	32.56±13.48
	5 h	50.48	40.98	44.42	27.05	29.51	38.49±9.96
	24 h	29.25	27.64	40.70	23.91	17.29	27.76±8.57
G2/M	0 min.	26.63	25.78	14.01	12.27	52.79	26.30±16.20
	30 min.	13.38	31.86	12.14	26.42	56.17	27.99±17.86
	2 h	34.97	25.69	26.48	38.85	40.08	33.21±6.78
	5 h	6.63	31.87	19.98	34.82	54.34	29.53±17.78
	24 h	24.88	23.29	35.32	33.92	48.48	33.18±10.07
AP	0 min.	17.70	10.99	13.79	19.66	3.74	13.18±6.26
	30 min.	11.16	18.74	17.22	16.87	9.20	14.64±4.19
	2 h	17.64	24.11	19.83	19.15	22.38	20.62±2.60
	5 h	17.99	14.18	9.53	15.27	13.83	14.16±3.06
	24 h	22.57	14.63	13.56	20.38	18.44	17.92±3.80

Statističkom analizom srednjih vrednosti FA i BMF grupa utvrđene su statistički značajne razlike u G0/G1 fazi 2 h ($t=-2.86$, $p<0.05$) i u G2/M fazi 2 h ($t=5.12$, $p<0.001$) i 24 h ($t=2.45$, $p<0.05$) nakon tretmana DEB-om.

Nakon tretmana DEB-om u BMF grupi, kao i nakon zračenja, najveći broj ćelija se uočava u S fazi na svim ispitivanim vremenima (Tabela 4.23. i Slika 4.13.), i to značajno više 30 min. nakon tretmana u poređenju sa kontrolnom grupom ($t=2.62$, $p<0.05$).

Tabela 4.23. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u BMF grupi pre i nakon tretmana DEB-om

Faza ćelijskog ciklusa	Vreme nakon tretmana DEB-om	BMF pacijenti					Σ
		1850	1990	2068	2083	3370	
G0/G1	0 min.	22.66	28.14	19.13	12.20	23.26	21.08±5.91
	30 min.	16.86	17.99	23.35	17.78	50.13	25.22±14.16
	2 h	19.37	52.09	39.00	31.20	40.00	36.33±12.07
	5 h	40.47	19.72	29.28	35.94	26.82	30.45±8.07
	24 h	21.73	28.95	23.96	26.08	13.04	22.75±6.05
S	0 min.	33.80	32.60	40.42	50.28	36.84	38.79±7.10
	30 min.	44.49	35.96	37.05	51.34	28.27	39.42±8.80
	2 h	33.68	20.44	34.24	37.45	29.14	30.99±6.60
	5 h	30.51	38.52	33.00	36.50	46.11	36.93±5.99
	24 h	32.80	36.17	39.47	28.93	46.63	36.80±6.75
G2/M	0 min.	26.97	27.62	29.12	28.73	26.03	27.69±1.27
	30 min.	24.89	42.32	21.24	16.58	13.67	23.74±11.24
	2 h	18.98	14.10	19.01	10.15	15.38	15.52±3.71
	5 h	7.96	16.50	12.84	16.56	14.71	13.71±3.56
	24 h	26.97	23.43	22.18	17.27	14.10	20.79±5.10
AP	0 min.	17.11	14.20	12.21	9.24	13.73	13.30±2.88
	30 min.	14.51	4.46	18.05	15.17	9.23	12.28±5.41
	2 h	28.75	14.57	8.23	22.18	16.45	18.04±7.79
	5 h	21.21	26.45	25.74	11.82	13.36	19.72±6.83
	24 h	18.61	12.17	14.24	28.42	27.19	20.13±7.40

Značajno manje ćelija u G0/G1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa u BMF grupi u odnosu na kontrolne ćelijske linije se uočava 24 h nakon tretmana ($t=-2.84$, $p<0.05$; $t=-2.87$, $p<0.05$) (Slika 4.13.).

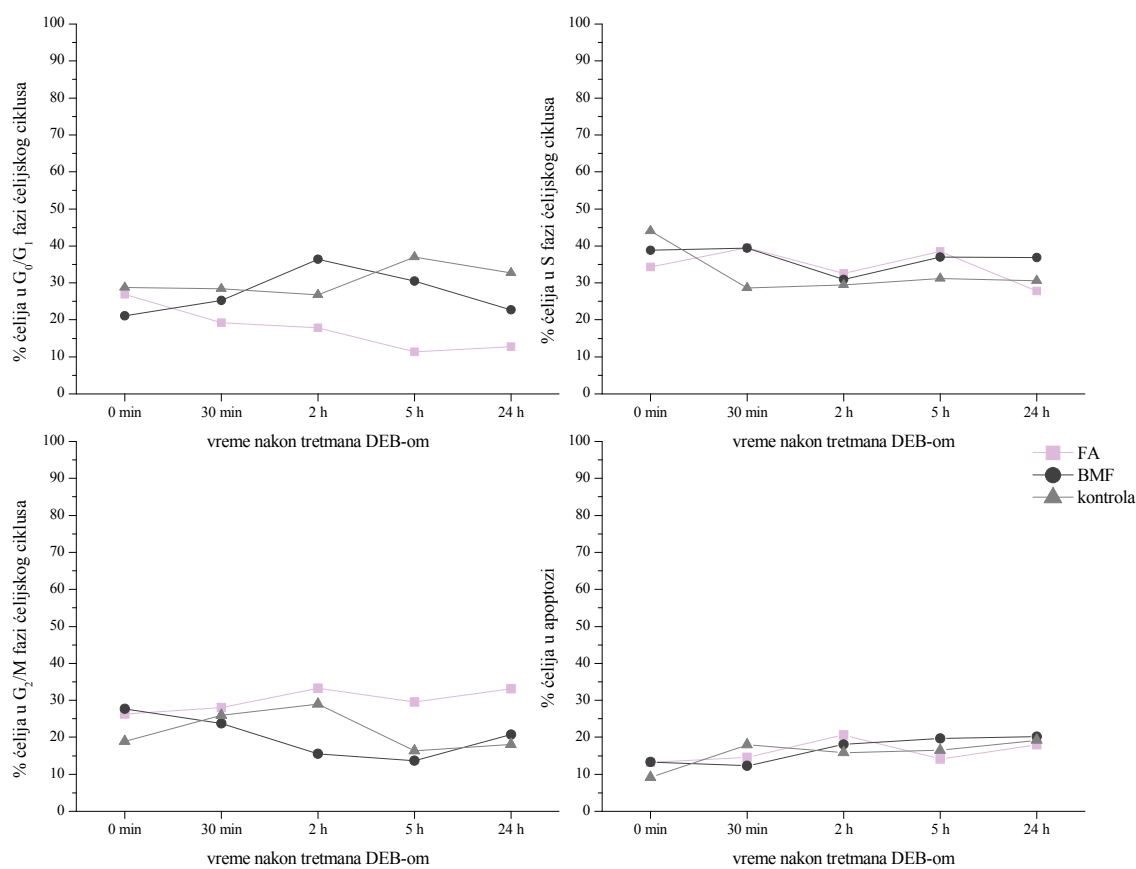
Korelacionom analizom utvrđene su negativne korelacije između procenta ćelija u G0/G1 fazi i procenta ćelija u S fazi, G2/M fazi i apoptozi, bez statističke značajnosti.

Procenat ćelija u G2/M fazi takođe negativno koreliše sa procentom ćelija koje su podlegle apoptozi.

Tabela 4.24. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om

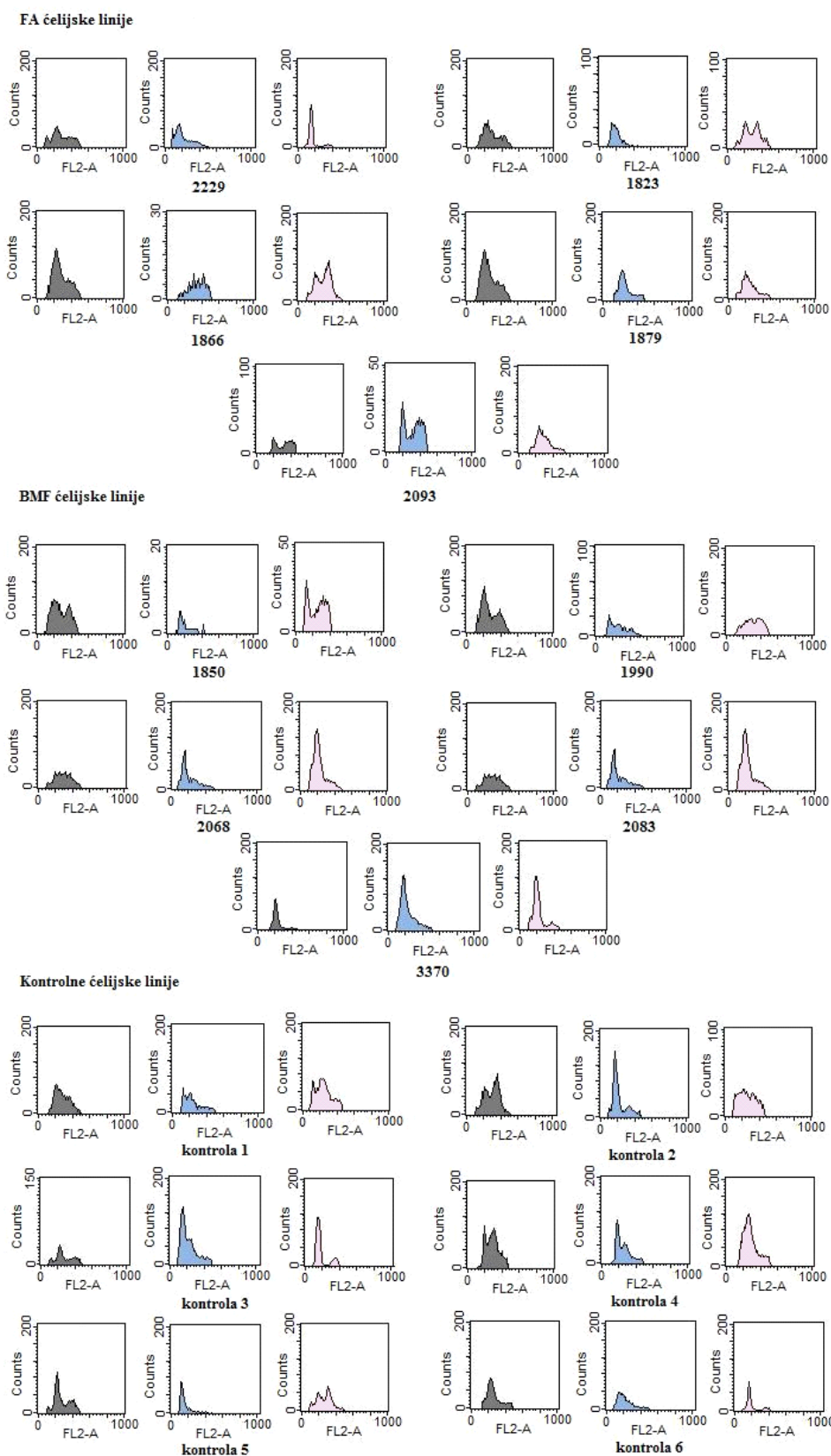
Faza ćelijskog ciklusa	Vreme nakon tretmana DEB-om	kontrolne ćelijske linije						Σ
		1	2	3	4	5	6	
G0/G1	0 min.	23.50	30.14	32.00	19.40	35.25	32.01	28.72±6.01
	30 min.	30.21	32.36	29.39	26.44	28.98	23.12	28.42±3.22
	2 h	20.54	30.77	35.62	23.18	21.43	28.96	26.75±5.99
	5 h	28.55	27.03	65.55	44.19	32.72	23.83	36.98±15.68
	24 h	29.01	28.17	36.86	35.66	26.32	39.87	32.65±5.52
S	0 min.	49.21	39.60	35.63	63.53	34.73	41.31	44.00±10.87
	30 min.	25.41	29.63	33.24	22.06	27.22	34.07	28.61±4.63
	2 h	38.69	17.56	31.04	34.23	26.91	28.18	29.43±7.21
	5 h	49.87	26.65	15.20	15.74	40.09	39.14	31.11±14.19
	24 h	38.62	35.78	26.23	19.21	35.89	27.63	30.56±7.44
G2/M	0 min.	17.12	22.78	17.93	16.46	23.92	15.36	18.93±3.55
	30 min.	31.45	16.96	20.55	30.82	29.57	26.05	25.90±5.95
	2 h	23.36	46.33	20.70	26.91	22.06	34.34	28.95±9.82
	5 h	8.71	19.28	11.12	23.12	21.63	14.15	16.34±5.88
	24 h	14.73	13.04	17.39	27.98	15.67	19.72	18.09±5.36
AP	0 min.	10.21	8.22	16.22	1.34	7.49	11.39	9.14±4.91
	30 min.	13.11	21.23	18.71	22.18	14.36	18.21	17.97±3.62
	2 h	19.70	6.18	13.71	16.48	29.88	9.44	15.90±8.38
	5 h	12.96	28.97	9.53	17.43	6.41	23.38	16.45±8.56
	24 h	17.83	23.04	20.26	18.83	22.19	12.97	19.19±3.62

U kontrolnim ćelijama nakon tretmana DEB-om utvrđena je negativna korelacija između procenta ćelija u G0/G1 fazi i procenta ćelija u S fazi i apoptozi (Tabela 4.24.). Procenat ćelija u G2/M fazi negativno koreliše sa procentom ćelija u S fazi, značajno 24 h nakon tretmana ($r=-0.90$, $p<0.05$) i procentom ćelija u apoptozi. Ostale korelacije su pozitivne i bez statističkog značaja.



Slika 4.13. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om

Na Slici 4.14. je prikaz analize protočnom citometrijom, odnosno procenat ćelija u G₀/G₁, S i G₂/M fazama ćelijskog ciklusa i procenat ćelija u apoptozi u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i 24 h nakon zračenja i tretmana DEB-om.



Slika 4.14. Flow citometrijski prikaz ćelijskog ciklusa i apoptoze pre i 24 h nakon zračenja i tretmana DEB-om

4.4. Analiza pojedinačnih nukleotidnih izmena

U ovoj studiji analizirane su izmene u 15 gena uključenih u puteve popravke DNK i 11 gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa.

U Tabelama 4.25. i 4.26. prikazani su geni u kojima je izvršena analiza pojedinačnih nukleotidnih izmena, njihova lokacija na hromozomima, kao i oznaka tražene nukleotidne izmene zajedno sa pozicijom u genu i tipom nukleotidne izmene.

Rezultati analize tumačeni su u skladu sa *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) bazom SNP-ova (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Rezultati su pokazali da je većina nukleotidnih izmena heterozigotna u obe grupe pacijenata.

U FA grupi, u homozigotnom obliku, izmene *missense* tipa utvrđene su u BARD1 genu (rs2070094) kod pacijenata 2229 i 1823, u BRCA1 genu (rs1799950) kod pacijenta 2093, genu NBS1 (rs1805794) kod 1879 i TP53BP1 genu (rs560191) kod 1866.

Sinonimne izmene su utvrđene u genu CCND1 (rs603965) kod pacijenta 1866 i genu RAD54B (rs2291439) kod pacijenta 1823.

Nukleotidne izmene u nekodirajućim regionima utvrđene su u genima XRCC3 (rs1799796), ATM (rs664677 i rs609429) i CDKN1B (rs34440) kod pacijenta 2093, u RAD52 genu (rs11226) kod pacijenata 1879 i 1990 i genu XRCC4 (rs1805377) kod pacijenta 1866. Kod svih pacijenata FA grupe utvrđena je izmena u kodirajućem regionu FANCD2 gena.

U BMF grupi *missense* nukleotidne izmene nađene su u genima BARD1 (rs2070094) i BRCA2 (rs144848) kod pacijenta 1990.

Sinonimne izmene su utvrđene u genu RAD54B (rs2291439) kod pacijenta 1850 i u genu CCND1 (rs603965) kod pacijenata 2068 i 2083.

Homozigotna nukleotidna izmena u nekodirajućem regionu utvrđena je samo kod pacijenta 3370 u genu RAD52 (rs11226). Kao i kod FA grupe, kod svih pacijenata BMF grupe utvrđena je izmena u kodirajućem regionu FANCD2 gena.

Tabela 4.25. Rezultati analize nukleotidnih izmena gena uključenih u puteve popravka DNK

GEN	dbSNP (rs#)	Nukleot. izmena	FA					BMF					Lokacija gena	Pozicija u genu	Učest. hz	Aminokis. izmena	
			2229	1823	1866	1879	2093	1850	1990	2068	2083	3370					
MGMT AGT	rs1803965	C/T	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	CT/GA	C/G	C/G	CT/GA	C/G	10q26	egzon 5	0.264	Leu84Leu
	rs12917	C/T	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	CT/GA	C/G	C/G	CT/GA	C/G		egzon 5	0.274	Leu115Phe
	rs2308321	A/G	A/T	AG/TC	A/T	A/T	AG/TC	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T		egzon 7	0.100	Ile174Val
XRCC2	rs3218536	G/A	G/C	GA/CT	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	7q36.1	egzon 3	0.056	Arg188His
	rs718282	C/T	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G		3'-UTR		
XRCC3	rs861539	C/T	C/G	CT/GA	CT/GA	C/G	C/G	CT/GA	C/G	CT/GA	CT/GA	CT/GA	CT/GA	14q32.3	egzon 8	0.495	Thr241Met
	rs1799796	A/G	A/T	AG/TC	AG/TC	AG/TC	G/C	AG/TC	AG/TC	AG/TC	AG/TC	AG/TC	AG/TC		intron 7	0.407	
	rs1799794	A/G	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T		5'-UTR	0.408	
XRCC4	rs1805377	G/A	G/C	G/C	A/T	G/C	G/C	GA/CT	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	5q13-q14	intron 7	0.492	
XRCC5	rs1051677	T/C	T/A	TC/AG	T/A	T/A	T/A	T/A	T/A	TC/AG	TC/AG	TC/AG	TC/AG	2q35	3'-UTR	0.218	
	rs2440	G/A	G/C	G/C	G/C	GA/CT	GA/CT	GA/CT	GA/CT	G/C	G/C	G/C	G/C		egzon 21	0.483	
ATM	rs664677	T/C	TC/AG	TC/AG	TC/AG	TC/AG	C/G	T/A	T/A	TC/AG	TC/AG	TC/AG	TC/AG	11q22-q23	intron 20	0.474	
	rs1800057	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	CG/GC	C/G	CG/GC	CG/GC	CG/GC	CG/GC		egzon 22	0.019	Pro1054Arg
	rs1801516	G/A	GA/CT	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	GA/CT	G/C	G/C	G/C	GA/CT		egzon 37	0.106	Asp1853Asn
	rs609429	C/G	CG/GC	CG/GC	CG/GC	CG/GC	G/C	C/G	C/G	CG/GC	CG/GC	CG/GC	CG/GC		intron 46	0.500	
BARD1	rs2070094	G/A	A/T	A/T	GA/CT	GA/CT	G/C	G/C	A/T	G/C	G/C	GA/CT	2q34-q35	egzon 6	0.370	Val507Met	
	rs2070093	C/T	C/G	C/G	CT/GA	CT/GA	C/G	C/G	CT/GA	CT/GA	C/G	C/G		egzon 6	0.340	His506His	
BRCA1	rs799917	C/T	C/G	CT/GA	CT/GA	CT/GA	CT/GA	C/G	CT/GA	C/G	CT/GA	CT/GA	CT/GA	17q21	egzon 10	0.500	Pro871Leu
	rs4986850	G/A	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C		egzon 10	0.055	Asp693Asn
	rs4986852	G/A	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	GA/CT	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C		egzon 10	0.033	Ser1040Asn
	rs1799950	A/G	A/T	A/T	A/T	A/T	AG/TC	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T		egzon 10	0.029	Gln356Arg
BRCA2	rs144848	A/C	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	C/G	AC/TG	AC/TG	A/T	13q12.3	egzon 10	0.395	Asn372His	
	rs4987117	C/T	C/G	C/G	CT/GA	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G		egzon 11	0.034	Thr1915Met	
FANCD2	rs3732974	C/G	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	3p26	egzon 2	0.021		
LIG4	rs1805388	C/T	CT/GA	CT/GA	C/G	CT/GA	CT/GA	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	13q33-q34	egzon 2	0.263	Thr9Ile	
	rs1805389	C/T	C/G	CT/GA	C/G	C/G	CT/GA	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G		egzon 2	0.072	Ala3Val	
NBS1	rs1063045	G/A	G/C	G/C	GA/CT	A/T	G/C	G/C	GA/CT	G/C	GA/CT	G/C	8q21	egzon 2	0.461	Leu34Leu	
	rs1805794	G/C	G/C	G/C	GC/CG	C/G	G/C	G/C	GC/CG	G/C	G/C	G/C		egzon 6	0.446	Glu185Gln	
RAD51	rs1801320	G/C	G/C	G/C	GC/CG	GC/CG	G/C	G/C	G/C	G/C	GC/CG	G/C	15q15.1	egzon 1	0.254		
RAD52	rs11226	C/T	CT/GA	C/G	CT/GA	T/A	CT/GA	C/G	T/A	CT/GA	CT/GA	T/A	12p13-p12.2	3'-UTR	0.495		
RAD54B	rs2291439	T/C	TC/AG	C/G	-/-	TC/AG	T/A	TC/AG	C/G	T/A	T/A	T/A	8q21.3-q22	egzon 5	0.469	Asn250Asn	

Tabela 4.26. Rezultati analize nukleotidnih izmena gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa

GEN	dbSNP (rs#)	Nukleot. izmena	FA					BMF					Lokacija gena	Pozicija u genu	Učest. Hz	Aminokis. izmena	
			2229	1823	1866	1879	2093	1850	1990	2068	2083	3370					
CCND1	rs603965	G/A	GA/CT	GA/CT	A/T	GA/CT	GA/CT	GA/CT	GA/CT	A/T	A/T	GA/CT	11q13	Exon 4	0.479	Pro241Pro	
CCNH	rs2266690	T/C	TC/AG	TC/AG	T/A	T/A	TC/AG	T/A	T/A	T/A	T/A	TC/AG	5q13.3-q14	Exon 7	0.322	Val270Ala	
p21/ CDKN1A	rs1801270	C/A	C/G	C/G	C/G	CA/GT	C/G	CA/GT	C/G	CA/GT	CA/GT	C/G	6p21.2	Exon 2	0.390	Ser31Arg	
	rs1059234	C/T	C/G	C/G	C/G	CT/GA	C/G	C/G	C/G	CT/GA	CT/GA	C/G		3' UTR	0.329		
CDKN2A	rs3731249	G/A	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	GA/CT	GA/CT	G/C	9p21	Exon 2	0.033	Ala148Thr
	rs11515	C/G	C/G	CG/GC	C/G	C/G	C/G	C/G	CG/GC	CG/GC	CG/GC	CG/GC	Exon 3		0.182		
	rs3088440	C/T	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	CT/GA	C/G	C/G	C/G	C/G	Exon 3		0.267		
CDKN1B	rs34330	C/T	C/G	CT/GA	CT/GA	CT/GA	T/A	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	12p13.1-p12	5' UTR	0.504		
RAD9A	rs1064876	G/A	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	11q13.1-q13.2	Exon 11	0.029		
CDK7	- rs nr	C/T	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	5q12.1	Exon 10			
CHEK2	- rs nr	C/del ¹	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	22q12.1	Exon 13			
TP53	rs1042522	C/G	GC/CG	GC/CG	GC/CG	C/G	C/G	GC/CG	C/G	C/G	C/G	C/G	17p13.1	Exon 4	0.493	Pro72Arg	
TP53BP1	rs560191	C/G	CG/GC	CG/GC	G/C	C/G	C/G	CG/GC	CG/GC	CG/GC	CG/GC	C/G	15q15-q21	Exon 9	0.496	Asp358Glu	
	rs689647	G/A	GA/CT	GA/CT	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	GA/CT	GA/CT	G/C		Exon 11	0.474	Gly417Ser	
TP53BP2	rs17739	G/A	GA/CT	G/C	GA/CT	GA/CT	G/C	G/C	G/C	G/C	GA/CT	G/C	1q42.1	Exon 18	0.449		

5. Diskusija

Sindromi genomske nestabilnosti nastaju kao posledica mutacija u genima koji kodiraju proteine uključene u odgovor na oštećenje i popravku DNK. Većina tih bolesti pokazuje slične *in vitro* ćelijske fenotipove, specifičan ćelijski ciklus, povećanu osetljivost na oksidativni stres i sklonost ka razvoju maligniteta.

Jedan od retkih, ali sa aspekta razumevanja ćelijskog odgovora na ozledu DNK, značajnih sindroma genomske nestabilnosti je Fankonijeva anemija. Osnovno obeležje FA ćelijskog fenotipa je visok nivo spontanih hromozomskih prekida, koji se može povećati izlaganjem ovih ćelija alkilirajućim agensima, kao što su mitomicin C i diepoksibutan. Manje poznata i još uvek sporna karakteristika FA ćelija je njihova radioosetljivost. Budući da je primena jonizujućeg zračenja često jedina opcija u lečenju takvih bolesti pred transplantaciju kostne srži, proučavanje odgovora na jonizujuće zračenje i njihove radioosetljivosti je od fundamentalnog značaja.

Transplantacija hematopoetskih matičnih ćelija je za sada jedina delotvorna terapija za obolele. Međutim, čak i u slučajevima uspešne transplantacije, FA pacijenti i dalje imaju visok rizik za razvoj solidnih tumora (Taniguchi i D'Andrea, 2002; Taniguchi i D'Andrea, 2006), čije je lečenje hemioterapijom ili zračenjem dodatno otežano zbog nepredvidivih efekata koji leže u osnovi odgovora na oštećenje DNK (Garcia-Higuera *i sar.*, 2001; Alter, 2002). Rizici od radioterapije kod FA bolesnika lečenih od kancera i dalje su u velikoj meri nepoznati (Esik *i sar.*, 2003).

Dosadašnja istraživanja pružaju vrlo kontradiktorne podatke o radioosetljivosti FA pacijenata, što je još jedan pokazatelj heterogenosti ovog oboljenja (Taylor, 2001). Veliki broj studija je pokazalo da ozračeni FA fibroblasti ispoljavaju sličnu radioosetljivost i istu sposobnost za formiranje kolonija nakon zračenja kao normalne ćelije (Duckworth-Rysiecki i Taylor, 1985; Marcou *i sar.*, 2001; Kalb *i sar.*, 2004). Slično je utvrđeno i za FA limfocite periferne krvi nakon zračenja X- ili γ -zračenjem, gde je uočena slična učestalost hromozomskih aberacija kao u ozračenim normalnim ćelijama (Natarajan *i sar.*, 1984; Duckworth-Rysiecki i Taylor, 1985).

Sa druge strane, postoje istraživanja u kojima je utvrđena izražena radioosetljivost FA ćelija (Barquinero *i sar.*, 2001; Djuzenova *i sar.*, 2001; Yamamoto

i sar., 2003), kao i povećan broj hromatidnih i hromozomskih aberacija nakon zračenja kako u limfocitima (Barquinero *i sar.*, 2001) tako i u fibroblastima (Parshad *i sar.*, 1983). Novija istraživanja opisuju i slučajeve radiorezistentnog odgovora FA limfocita nakon izlaganja jonizujućem zračenju (Petrović *i sar.*, 2009).

Kao što se moglo videti na osnovu brojnih studija na ćelijama FA pacijenata, procena radioosetljivosti je teška i nepredvidiva. Nakon izlaganja jonizujućem zračenju, odgovor na oštećenje DNK nije isti kod svih osoba, iako bi apsorbirana doza trebalo da bude slična, što ukazuje da biološki efekat zavisi uglavnom od kapaciteta popravke DNK pojedinca (Natarajan *i sar.*, 1982; Joksić *i sar.*, 1997).

Budući da je spontana i indukovana hromozomska nestabilnost glavna FA ćelijska karakteristika, odgovor na zračenje pokušali smo proceniti CB-mikronukleusnim testom, koji se koristi kao indikator radijacionog oštećenja u biomonitoringu humanih populacija (Muller *i sar.*, 1996). Mikronukleusi (MN) nastaju kao posledica deobe ćelija koje sadrže strukturne hromozomske aberacije i omogućavaju pouzdanu kvantifikaciju radioosetljivosti (Fenech, 1993). Njihova učestalost koreliše sa ćelijskim preživljavanjem, te se stoga mogu koristiti za predviđanje odgovora na radioterapiju, kao brza, alternativna metoda (Joksić, 2004).

Rezultati CB-mikronukleusnog testa na fibroblastima pokazali su da je spontana učestalost MN u FA grupi blago povišena u odnosu na kontrolu, dok je u BMF grupi značajno niža. Budući da je jedna od karakteristika FA ćelija povećan nivo spontanih hromozomskih prekida, povišena bazalna učestalost MN bila je očekivana. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima autora koji su takođe utvrdili povišenu učestalost bazalnih mikronukleusa u FA fibroblastima (Raj i Heddle, 1980).

Tretman DEB-om daje slične rezultate. Poređenjem srednjih vrednosti MN utvrđeno je da DEB blago povećava akumulaciju MN u odnosu na kontrolu. Takođe, prinos MN indukovanih DEB-om kod FA pacijenata je za 21.52 % viši u odnosu na BMF pacijente. Povišena učestalost MN nakon tretmana alkilirajućim agensima utvrđena je od strane nekoliko autora (Ruppitsch *i sar.*, 1998; Camelo *i sar.*, 2008).

Međutim, nakon zračenja je utvrđena niža učestalost MN u obe grupe pacijenata u odnosu na kontrolu. Slično kao nakon tretmana DEB-om prinos

zračenjem indukovanih MN kod FA pacijenata je za 32.09 % viši u odnosu na BMF pacijente. Osim toga, poređenjem proliferativne sposobnosti utvrđena je veća inhibicija proliferacije u obe grupe pacijenata u odnosu na kontrolne ćelije. U smislu međuindividualne varijabilnosti, rezultati CB-mikronukleusnog testa na fibroblastima pokazali su da u FA grupi sva četiri FANCD2 pacijenta pokazuju rezistentan odgovor na *in vitro* ozračivanje, dok je 2229 (FANCA) blago rezistentan. U BMF grupi 1850 je blago rezistentan, dok ostala 4 pacijenta imaju rezistentan odgovor na zračenje. Dosadašnja istraživanja pružaju malo podataka o učestalosti MN u FA ćelijama nakon zračenja. U studiji Djuzenove i saradnika (2004) u FA ćelijama je utvrđena povećana učestalost MN nakon izlaganja γ -zračenju, dozom 1-3 Gy, ali i neuobičajeno niska indukcija MN u kontrolnim ćelijskim linijama. U istoj studiji utvrdili su i da je proliferativni potencijal FA fibroblasta manji u odnosu na kontrolu. Sličan odgovor na ozračivanje u normalnim fibroblastima utvrđen je i u studiji Nachtrab-a i saradnika, gde je prosečna učestalost MN na 2 Gy iznosila oko 30-35 (Nachtrab *i sar.*, 1998). Razlika između navedenih rezultata i rezultata Djuzenove i saradnika, mogao bi biti posledica interindividualnih razlika među pacijentima, međupopulacione varijabilnosti, kao i činjenice da su studije rađene bez poznavanja komplementacionih grupa pacijenata. Takođe, uočeno smanjenje učestalosti MN nakon zračenja može nastati usled eliminacije oštećenih ćelija apoptozom, o čemu će biti reči kasnije.

Dobijeni rezultati su potvrdili koliko je teško predvideti odgovor FA ćelija na delovanje jonizujućeg zračenja, kao i da je nemoguće proceniti njihovu radioosetljivost samo na osnovu CB-mikronukleusnog testa. Iako ovaj test ne bi mogao poslužiti u dijagnostičke svrhe zbog izraženih interindividualnih razlika, uočeno povećanje indukovanih MN u FA grupi u odnosu na BMF grupu, ipak ne isključuje primenu ovog testa kao dopunskog, posebno u većim studijama.

Kao što je već pomenuto, dvolančani prekidi DNK su biološki najznačajnije lezije indukovane jonizujućim zračenjem. Ove lezije destabilizuju hromatin, deluju na signaliziranje i puteve popravke na mestu nastanka. Nepopravljeni ili pogrešno popravljani dvolančani prekidi mogu izazvati hromozomsku nestabilnost ili nekontrolisanu deobu ćelija i time ozbiljno ugroziti integritet genoma (Hoeijmakers, 2001; Khanna i Jackson, 2001; van Gent *i sar.*, 2001; Rooney *i sar.*, 2004).

Jedan od najranijih koraka u odgovoru ćelije na dvolančane prekide je fosforilacija histona H2AX na serinskom mestu 139 (γ -H2AX) (Rogakou *i sar.*, 1998; Marti *i sar.*, 2006). Fosforilacijom, H2AX postaje glavni signal za grupisanje proteina na mestu DNK lezije, a nastali fokusi predstavljaju kvantitativne markere dvolančanih prekida. Njihova analiza omogućila je razumevanje puteva popravke, kontrole ćelijskog ciklusa i konačne odluke ćelije o životu ili smrti (Rogakou *i sar.*, 1998; Rogakou *i sar.*, 2000; Sedelnikova *i sar.*, 2003).

Nakon zračenja, fosforilacija se događa brzo na mestu oštećenja; γ -H2AX fokusi se mogu detektovati u roku od 3 minuta i dostižu plato nakon 10-30 minuta. Većina fokusa nestaje 6 sati kasnije, što ukazuje na završetak popravke dvolančanih prekida (Bouquet *i sar.*, 2006). Ukoliko γ -H2AX fokusi ne nestanu posle više od 24 sata, oni mogu biti znak nepopravljenih dvolančanih prekida ili trajnih promena u hromatinu (Banath *i sar.*, 2004; Suzuki *i sar.*, 2006; Leskovac *i sar.*, 2010).

Dosadašnja istraživanja kinetike oporavka dvolančanih prekida na ćelijama FA pacijenta pružaju malo podataka o stvarnoj dinamici, jer su obuhvatala kratki vremenski period i uglavnom bila usmerena na praćenje inicijalnih oštećenja, neposredno nakon zračenja ili tretmana alkilirajućim agensima. Povećanje inicijalnih oštećenja utvrđeno je u istraživanjima komet testom nakon tretmana X-zračenjem na FA mononukleusnim ćelijama (Djuzenova *i sar.*, 2001) i FA fibroblastima (Djuzenova i Flentje, 2002). Nasuprot rezultatima Djuzenove i saradnika, analiza FA limfoblastoidnih ćelija različitih komplementacionih grupa, pomoću elektroforeze u pulsirajućem gelu (engl. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), pokazala je sličan broj inicijalnih dvolančanih prekida kao u kontroli (Casado *i sar.*, 2005). Treba napomenuti da su tom studijom bili obuhvaćeni samo pacijenti koji pripadaju FANCA, FANCC i FANCF komplementacionim grupama. Blago povišen nivo indukovanih oštećenja utvrđen je i na FA limfocitima komet testom, ali bez statističkog značaja (Mohseni-Meybodi *i sar.*, 2009). Razlozi neslaganja dobijenih rezultata među navedenim studijama najverovatnije su usled razlika u tipu ćelija na kojima su vršena ispitivanja, jer nisu sve ćelije jednako osetljive na zračenje. Nadalje, u studijama su ispitivane FA ćelije poreklom od pacijenata različitih

komplementacionih grupa, što je moglo znatno uticati na ishod rezultata. Na kraju, ne treba zanemariti ni razlike u osetljivosti izabranih tehnika u ovim istraživanjima.

Analizom γ -H2AX fokusa, imunocitohemijskom metodom, u našoj studiji kvantifikovan je broj spontanih dvolančanih prekida, a njihovo praćenje u različitim vremenskim periodima nakon izlaganja jonizujućem zračenju i tretmana DEB-om omogućilo je uvid u kinetiku oporavka. Smatrajući da je period dostizanja maksimalnog broja dvolančanih prekida 30 minuta nakon zračenja verodostojniji pokazatelj indukovanih oštećenja, nije praćen inicijalni broj dvolančanih prekida. Ostala izabrana vremena (2, 5 i 24 sata) pokrivaju periode aktivacije proteina uključenih u popravku indukovanih oštećenja. Proces spajanja dvolančanih prekida događa se 2 do 4 sata nakon indukcije oštećenja zračenjem u ćelijskim linijama sisara (Zaffaroni *i sar.*, 1994; Banath *i sar.*, 1998), dok se stvaran broj rezidualnih prekida uočava 20 časova posle zračenja (Eguchi-Kasai *i sar.*, 1991).

U našoj studiji utvrđena je viša učestalost spontanih dvolančanih prekida u FA i BMF grupi u poređenju sa kontrolom. Povišena učestalost spontanih hromozomskih prekida u FA ćelijama najverovatniji je uzrok visoke vrednosti bazalnih DNK oštećenja. Prema nekim autorima, perzistentna bazalna oštećenja DNK su značajan pokazatelj poremećaja puteva popravke DNK (Rajeswari *i sar.*, 2000). Viši bazalni nivo DNK oštećenja utvrđen je takođe u studiji Mohseni-Meybodi i saradnika (2009) kod FA pacijenta i u leukocitima pacijenata obolelih od raka dojke (Shahidi *i sar.*, 2007).

Nakon ozračivanja, FA fibroblasti imaju najveću učestalost zračenjem indukovanih γ -H2AX fokusa nakon 30 minuta, kada ujedno postižu i plato formiranja fokusa. Iako se u FA grupi uočava trend opadanja broja dvolančanih prekida tokom vremena, 24 h nakon zračenja incidenca je i dalje visoka, značajno viša u poređenju sa BMF i kontrolnom grupom. Takođe, FA ćelije pre zračenja i 24 h nakon zračenja karakteriše značajno viši procenat fokus-pozitivnih ćelija. Nasuprot FA, u BMF grupi se najveći broj dvolančanih prekida uočava 2 h nakon zračenja, nakon čega se, u narednim periodima, uočava trend smanjenja. Broj dvolančanih prekida se 24 h nakon zračenja značajno smanjuje i u odnosu na stanje pre zračenja nema statistički značajnih razlika.

Rezultati ukazuju da se FA pacijenti mogu razlikovati od ostalih pacijenata sa aplazijom kostne srži, na osnovu γ -H2AX testa 24 sata nakon izlaganja ćelija jonizujućem zračenju. γ -H2AX fokusi 24 h posle zračenja se mogu uzeti kao pouzdana mera ukupnih sposobnosti fibroblasta za popravku dvolančanih prekida (Mirzayans *i sar.*, 2006) i očigledno je da svaki od ispitivanih FA pacijenata pokazuje povećan nivo nepopravljenih dvolančanih prekida u odnosu na stanje pre zračenja.

U FA ćelijama učestalost rezidualnih γ -H2AX fokusa je oko 3 puta veća u odnosu na BMF ćelijske linije i u proseku 9 puta veća u odnosu na stanje pre zračenja. Budući da je opšte prihvaćeno da učestalost γ -H2AX pozitivnih fokusa, u različitim intervalima posle tretmana agensima koji oštećuju DNK, odražava kinetiku popravke dvolančanih prekida (Rogakou *i sar.*, 1999; Redon *i sar.*, 2002), može se zaključiti da FA ćelijske linije popravljaju dvolančane prekide indukovane zračenjem sporo, sa značajnim kašnjenjem u odnosu na BMF i kontrolne ćelijske linije. Dok je 14.16 % ćelija u netretiranim FA kulturama pre zračenja γ -H2AX fokus-pozitivno, a broj fokusa po ćeliji 1.06 ± 0.32 , procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija 24 h posle zračenja je 57.47, odnosno sadrži 9.53 ± 3.19 fokusa po ćeliji. Poznato je da ćelije koje prolaze kroz DNK oštećenja, signalizacijom indukuju zastoje u ćelijskom ciklusu u cilju obezbeđivanja dovoljno vremena za popravku. Tokom ovog perioda, ćelija aktivira kaskadu proteina potrebnih za kompletnu popravku ili podleže ćelijskoj smrti apoptozom. Kašnjenje u kinetici popravke FA ćelija svakako potvrđuje prirodu ove bolesti, kao poremećaja DNK popravke, ali u isto vreme daje priliku za neposrednu dijagnozu FA ćelijskog fenotipa. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija uočen u BMF ćelijama (15.22 % i 41.82 %) i u kontroli (12.91 % i 32.01 %) potvrđuje razliku sa FA ćelijama i ukazuje da kašnjenje u kinetici popravke predstavlja jedinstvenu karakteristiku FA ćelijskog fenotipa.

Nekoliko ranijih studija je ukazalo na defekte u spajanju dvolančanih prekida kod FA pacijenata (Sasaki i Tonomura, 1973; Natarajan *i sar.*, 1984; Casado *i sar.*, 2005) i otkako je kvantifikacija γ -H2AX fokusa uvedena kao "zlatni" standard za praćenje nivoa dvolančanih prekida u humanim ćelijama (Fernandez-Capetillo *i sar.*, 2004), smatrali smo da bi praćenje kinetike njihove popravke moglo poslužiti kao brzi

test za identifikaciju FA u većoj grupu BMF pacijenata, omogućavajući procenu pojedinačnih sposobnosti za popravku dvolančanih prekida, odnosno radioosetljivosti.

Usled toga, uočeno kašnjenje u kinetici popravke dvolančanih prekida indukovanih zračenjem u FA fibroblastima u odnosu na BMF fibroblaste se može smatrati pokazateljem konstitutivne radioosetljivosti pre određivanja i primene doze za transplantaciju hematopoetskih matičnih ćelija. Ovaj test je znatno brži od analize hromozomskih aberacija posle tretmana alkilirajućim agensima i može se lako automatizovati pomoću protočne citometrije čime se značajno smanjuje vreme između uzimanja uzorka ćelija od pacijenata i dostupnosti rezultata.

Nekoliko studija sugerise da postoji veza između neefikasne popravke dvolančanih prekida u odnosu na normalne ćelije kod pacijenata obolelih od kancera ozračenih *in vitro* i kliničke preosetljivosti (Murray i Beg, 2004; Mirzayans *i sar.*, 2006). Naši rezultati potvrđuju ranija istraživanja, koja su ukazala na kašnjenje kinetike popravke dvolančanih prekida posle zračenja u FA ćelijama (O'Driscoll i Jeggo, 2006; Thompson i Hinz, 2009).

Budući da brzi gubitak, iščezavanje γ -H2AX fokusa zavisi od funkcionalnosti repera, zadržavanje γ -H2AX fokusa u ćelijama prema nekim autorima može biti pokazatelj gubitka proliferativnog potencijala. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da ćelije sa poremećenom popravkom zadržavaju više fokusa i više ćelija sa fokusima kada se analiziraju 24 sata nakon zračenja, kao i da procenat ćelija sa rezidualnim fokusima koreliše sa procentom ćelija koje su izgubile proliferativni potencijal (Klokov *i sar.*, 2006; Banath *i sar.*, 2010). Drugim rečima, praćenjem ćelija sa rezidualnim fokusima moguće je proceniti osetljivost na zračenje, odnosno proporciju ćelijskog pula koji će podleći reproduktivnoj ili interfaznoj ćelijskoj smrti.

Iako naši rezultati pokazuju da su rezidualni γ -H2AX fokusi ključni faktor koji određuje sudbinu ćelije, prema nekim autorima početni nivo γ -H2AX fokusa može biti prediktivni pokazatelj ćelijskog opstanka. Udeo ćelija bez γ -H2AX fokusa, odmah nakon izlaganja zračenju može poslužiti kao pokazatelj "ćelijskog preživljavanja", zajedno sa ćelijama bez γ -H2AX fokusa 24 sata posle tretmana, što je u direktnoj korelaciji sa kapacitetom popravke (Banath i Olive, 2003; Banath *i sar.*, 2010).

Praćenje broja γ -H2AX fokusa u ćelijama i distribucije γ -H2AX fokusa u nukleusima tokom perioda od 24 h, daje dovoljno podataka o ćelijskoj vijabilnosti, brzini oporavka i procentu ćelija koje će zasigurno biti izgubljene tokom ćelijskog ciklusa. Analiza distribucije γ -H2AX fokusa u nukleusima, pokazala je da se u FA grupi nakon zračenja konstantno održava visok procenat ćelija sa 20 i više fokusa po nukleusu i sa početnih 4.70 % pre zračenja dostiže 17.80 %, 24 h nakon zračenja. Nasuprot FA grupi, u BMF i kontroli, broj ćelija sa više od 20 prekida je 5.67 % i 2.17 % pre zračenja, odnosno 4.69 % i 0.90 %, 24 h nakon zračenja.

Generalno, u FA ćelijama se tokom vremena uočava akumulacija ćelija sa visokim brojem fokusa po nukleusu i polazeći od pretpostavke da će sve ćelije koje sadrže više od 30 prekida podleći ćelijskoj smrti, uočava se drastična razlika između FA, BMF i kontrole 24 h nakon zračenja. U FA grupi čak 10.66 % ćelija je nereparabilno, dok se u BMF i kontroli broj ćelija vraća na bazalne vrednosti (1.75 % i 0.27 %). Uočena varijabilnost u distribuciji fokusa po nukleusu kod FA ćelija je još jednom ukazala na poteškoće u popravci nastalih oštećenja. Poređenjem procenta ćelija pre i nakon zračenja, možemo pretpostaviti da će čak 40 % ćelija biti zauvek izgubljeno usled oštećenja.

Za razliku od jonizujućeg zračenja, DEB kao alkilirajući agens slabo indukuje γ -H2AX i nakon tretmana DEB-om nije uočena razlika između FA, BMF i kontrolnih ćelijskih linija. U studiji Pichierri i saradnika (2002) posle tretmana mitomicinom takođe nije utvrđena razlika u formiranju dvolančanih prekida između FA-C i *wild type* ćelija. Štaviše, nema razlike u DEB indukovanom nastanku dvolančanih prekida, što sugeriše da alkilirajući agensi izazivaju različitu signalizaciju za popravku DNK u odnosu na signalizaciju dvolančanih prekida indukovanih jonizujućim zračenjem. Nakon tretmana DEB-om, kao i u slučaju broja γ -H2AX fokusa u ćelijama, nisu utvrđene značajnije fluktuacije ni u broju fokusa po nukleusu u obe grupe pacijenata u odnosu na kontrolu.

Iako γ -H2AX fokusi imaju važnu ulogu u DNK popravci i remodeliranju hromatina tokom odgovora na oštećenje DNK (Fernandez-Capetillo *i sar.*, 2003; Reina-San-Martin *i sar.*, 2003) oni slabo reaguju na alkilirajuće agense, što ih čini veoma specifičnim indikatorima dvolančanih prekida. Većina pređašnje literature

ukazuje da FA ćelijski fenotip može biti prepoznat testiranjem sa DNK alkilirajućim agensima, koji povećavaju spontanu hromozomsku nestabilnost. Međutim, nedavno je Gennery sa svojim saradnicima (2004) ukazao da i drugi nasledni sindromi, kao što su "Ataxia telangiectasia-like" oboljenje, "Nijmegen breakage" sindrom i drugi sindromi primarne imunodeficijencije, mogu dati pozitivne rezultate tokom testiranja sa alkilirajućim agensima, ukazujući time na preklapanje sa FA ćelijskim fenotipom. Sličnosti u kliničkim manifestacijama i ćelijskim fenotipovima posmatrani u nekoliko sindroma naglašavaju potrebu za tačnom dijagnozom sindroma genomske nestabilnosti, koja se više ne može postaviti na osnovu specifične reakcije na alkilirajuće agense. Tako na primer opisano je nekoliko FA pacijenata sa izraženijom imunodeficijencijom (Taniguchi *i sar.*, 2002), dok su neki pacijenti sa "Nijmegen breakage" sindromom opisani sa aplastičnom anemijom, komplikacijom najčešće povezanom sa Fankonijevom anemijom (Resnick *i sar.*, 2002).

Utvrđeno kašnjenje u dinamici oporavka dvolančanih prekida u FA fibroblastnim ćelijama potvrđuje da je ovo "oboljenje DNK reparacije", ali istovremeno ukazuje koliki je značaj neoštećenog FA puta u očuvanju genomske stabilnosti.

Dugo godina je funkcija FA puta, ali i povezanost sa drugim putevima popravke prevashodno HR i NHEJ u fokusu istraživanja. Nedavno su dve grupe istraživača, Adamo i saradnici (2010) i Pace i saradnici (2010) pokazali da ključna funkcija FA proteina leži u regulaciji izbora puta popravke nastalih lezija. FA proteini favorizuju "error-free" puteve popravke, posebno HR nasuprot konkurentnom NHEJ (Bunting i Nussenzweig, 2010). Pretpostavljena su dva potencijalna modela koja su u saglasnosti sa njihovim istraživanjima; FA proteini su direktni antagonisti NHEJ, blokiraju ili uklanjaju NHEJ proteine na mestu oštećene DNK i/ili FA proteini saraduju u obradi dvolančanih prekida i interlančanih lezija potpomažući HR i ometajući NHEJ (Adamo *i sar.*, 2010).

U odgovoru na indukovana oštećenja FA jedarni kompleks katalizuje monoubikvitinizaciju FANCD2/FANCI heterodimera, koja potpomaže njihovo grupisanje na mestu oštećene replikativne viljuške. FANCD2/FANCI nadalje

kolokalizuju sa BRCA2 (FANCD1), PALB2 (FANCN) i FANCI, koji su neophodni za homologu rekombinaciju (Wang, 2007).

Kašnjenje kinetike oporavka dvolančanih prekida u grupi od četiri FANCD2 pacijenta i visok procenat nepopravljenih oštećenja verovatno je posledica poremećaja u FA putu. FANCD2 je ključni protein puta. U odsustvu FANCD2, NHEJ faktori se neadekvatno grupišu na mestima oštećenja DNK, usmeravajući popravku u smeru NHEJ, "error-prone" reparacionog puta koji je sklon grešci (Adamo *i sar.*, 2010).

Pošto je fosforilisani H2AX široko prihvaćen marker dvolančanih prekida, koji su jedan od prekursora mikronukleusa, u ovoj studiji ispitan je i odnos ova dva fenomena. Ocenjen je fosforilacioni status histona H2AX, odnosno distribucija γ -H2AX u mikronukleusima formiranim posle tretmana mononukleusnih fibroblastnih ćelija jonizujućim zračenjem.

Rezultati su pokazali da značajan broj mikronukleusa koji nastaje nakon izlaganja jonizujućem zračenju sadrži fosforilisani oblik histona H2AX. To je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima koja su pokazala, da mikronukleusi indukovani jonizujućim zračenjem nastaju kao posledica nepopravljenih dvolančanih prekida i sadrže oštećene hromosome obeležene sa γ -H2AX (MacPhail *i sar.*, 2003).

U FA grupi većina novoformiranih mikronukleusa indukovanih zračenjem je γ -H2AX fokus-pozitivna, što ukazuje da mikronukleusi indukovani zračenjem najverovatnije sadrže fragmente oštećenih hromozoma. Prema istraživanjima nekih autora postojanje γ -H2AX fokus-pozitivnih MN može ukazivati na aberantnu strukturu hromatina koja nastaje kao posledica ilegitimne rekombinacije, poremećaja u kontroli puteva popravke i kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa (O'Connor *i sar.*, 1997; Suzuki *i sar.*, 2006). Povišen broj γ -H2AX fokus-pozitivnih mikronukleusa je konstantan, čak i 24 časa posle zračenja, što je u skladu sa rezultatima dobijenim analizom γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija. Odnos γ -H2AX fokus-pozitivnih i fokus-negativnih mikronukleusa je ujednačen.

Za razliku od FA ćelija u BMF grupi uočava se dvostruko veći broj γ -H2AX fokus-negativnih MN u odnosu na γ -H2AX fokus-pozitivne, dok je ukupan broj MN manji nego u FA grupi. Nakon zračenja u kontrolnim ćelijama uočava se mali broj γ -H2AX fokus-pozitivnih MN, dok je broj γ -H2AX fokus-negativnih MN oko 4-6 puta

veći. U BMF grupi i kontroli, mikronukleusi koji se formiraju nakon zračenja su γ -H2AX fokus-negativni, što ukazuje da su ćelije sa nepopravljenim dvolančanim prekidima najverovatnije bile blokirane pre ulaska u mitozu, što je za posledicu imalo manje γ -H2AX fokus-pozitivnih mikronukleusa i manje mikronukleusa sveukupno.

Prema nekim autorima diskretni γ -H2AX fokusi ukazuju na prisustvo dvolančanih prekida, dok veliki uniformni γ -H2AX obeleženi fokusi koji pogađaju celu mikronukleusnu površinu, ukazuju na degradaciju genomske DNK u jedru ćelije (Rogakou *i sar.*, 2000; Medvedeva *i sar.*, 2007). Nasuprot jedru ćelije u kome se efikasno aktiviraju DDR putevi nakon DNK oštećenja, mikronukleusi imaju narušen kapacitet grupisanja DDR proteina i potpuno drugačiju dinamiku proteina u odnosu na glavno jedro iste ćelije. Prema dosadašnjim istraživanjima pretpostavlja se da nepopravljeni dvolančani prekidi u mikronukleusima predstavljaju signal za pokretanje degradacije DNK i uvođenje ćelija u apoptozu (Terradas *i sar.*, 2010).

Takođe, povećano prisustvo MN u FA ćelijama može biti pokazatelj umnoženih sekvenci DNK tokom S faze. Dosadašnje studije Fenech-a su pokazale da se umnožena (amplifikovana) DNK može eliminisati putem rekombinacije između homologih sekvenci formirajući dvominutne fragmente sastavljene od acentrične i atelomerne DNK, koji se lokalizuju u različitim regionima jedra. To bi značilo da jedro ima kapacitet da "oseti" prekomernu DNK koja se ne uklapa adekvatno u jedarni matriks, ukazujući na visok nivo DNK reparacije ili jedarnih "housekeeping" procesa (Fenech, 2006). Nastala oštećenja se lokalizuju kroz proces jedarnog pupljenja tokom S faze ćelijskog ciklusa i odstranjuju iz ćelije u formi mikronukleusa tokom mitoze (Shimizu *i sar.*, 2000; Fenech, 2006). Moguće je da kod naših FA pacijenata amplifikovana DNK sadrži dvolančane prekide koje jedro "oseti" i teži da ih eliminiše putem MN usled neefikasnih mehanizama njihove popravke.

Prisustvo γ -H2AX u mikronukleusima FA fibroblastnih ćelija pokazuje da ćelije pokušavaju eliminisati nepopravljena oštećenja, ali i da su neke ćelije sa oštećenjima prošle kroz mitozu. U trenutku kada broj dvolančanih prekida prevaziđe kapacitet ćelije za njihovu popravku, ćelija će podleći apoptozi, organizovanom, visoko regulisanom načinu umiranja. Neke ćelije međutim, usled poremećaja u regulatornim mehanizmima uključenim u odgovor na indukovane dvolančane prekide,

odlažu i popravku nastalog oštećenja, što može dovesti do neapoptske ćelijske smrti usled poremećene mitoze, koja se još naziva "mitotska katastrofa" (Okada i Mak, 2004). Takve mitoze nastaju kao posledica poremećaja u kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa, posebno G2/M. Poremećaj ili gubitak funkcije kontrolnih tačaka, dovodi do pogrešnog razdvajanja hromozoma, inhibicije ćelijske deobe i formiranja nevijabilnih ćelija sa mikronukleusima. Nastali mikronukleusi se smatraju indikatorima "mitotske katastrofe" (Huang *i sar.*, 2005).

Najveći broj γ -H2AX fokus-pozitivnih mikronukleusa i mikronukleusa uopšte uočen je kod FANCA pacijenta (2229), što je u skladu sa rezultatima Rani i saradnika (2008), koji su utvrdili da se *Fanca*^{-/-} ćelije usled inaktivacije p53 ne zaustavljaju u G2 fazi već ulaze u mitozu i potencijalnu smrt putem "mitotske katastrofe" i/ili apoptoze. Poremećaj u mitozu, praćen povećanom produkcijom mikronukleusa utvrđen je i u FANCD2 ćelijama (Chan *i sar.*, 2009).

Nedavne studije pokazale su da FA put ima važnu ulogu u mitozu. FA ćelije normalno napreduju kroz mitozu, ali imaju poremećaj u razdvajanju hromozoma. Otkriveno je da se FANCD2 lokalizuje na mestima hromozomskih prekida i da deluje sinergistički sa BLM (engl. *Bloom syndrome protein*) u sprečavanju nastanka mikronukleusa i hromozomskih poremećaja. FA put učestvuje u održavanju hromozomske stabilnosti na fragilnim mestima, neophodan je za odgovarajuće razdvajanje hromatida i/ili da spreči hromozomske prekide na kraju deobe ćelija (Naim i Rosselli, 2009). FANCD2 i FANCI, ključni FA proteini, su lokalizovani na mestima DNK mostova (eng. *ultrafine DNA bridges*, UFBs), koji povezuju sestrinske hromatide tokom ćelijske deobe. Prema Vinciguerra i saradnicima, kod FA-deficijentnih ćelija, dolazi do povećanja broja DNK mostova što koreliše sa poremećajem citokineze i povećanjem broja binukleusnih ćelija. Prema navedenim autorima ovaj sled događaja, koji na kraju rezultira poremećajem u samoj mitozu, mogao bi biti odgovoran za aplaziju kostne srži, što je osnovna klinička karakteristika obolelih od Fankonijeve anemije (Vinciguerra *i sar.*, 2010).

Novija istraživanja sugerišu da bi se hromozomske anomalije u FA ćelijama mogle pripisati nepoznatoj ulozi FANC puta u mitozu. FA ćelije normalno napreduju kroz mitozu, ali je segregacija hromozoma poremećena. Praćenjem FANCD2 tokom

mitoze, utvrđena je njegova dinamična lokalizacija: na početku mitoze, FANCD2 je rasut u citoplazmi, dok se na kraju deobe vraća u jedro (Naim i Rosselli, 2009). Primećeno je da neke ćelije sadrže mesta sa monoubikvitinizovanim FANCD2 na mitotskim hromozomima, koja su potpuno odsutna u ćelijama u kojima je oštećen FA kompleks, neophodan za monoubikvitinizaciju FANCD2. Sa druge strane u slučaju FA-D2 (FANCD2^{-/-}) ova mesta se mogu uočiti, ali su ređa, što se objašnjava činjenicom da su mutacije FANCD2 hipomorfne i da rezidualni protein može biti monoubikvitinizovan (Kalb *i sar.*, 2007). Prisustvo γ -H2AX u mitotskim hromozomima, koji nastaju kao odgovor na oštećenje DNK, smatra se dokazom da je došlo do izmene DNK strukture ili je znak prethodno popravljene lezije. Analizama je utvrđeno da jedan deo DNK lezija podstiče kolokalizaciju FANCD2 i γ -H2AX. Pored toga, utvrđeno je da je FANCD2 povezan sa hromatidnim mestima koja prolaze neispravna razdvajanja, povećavajući mogućnost da FANCD2 mesta odražavaju narušenu konformaciju hromatina. Otkriveno je da se FANCD2 lokalizuje na mestima hromozomskih prekida, odnosno da mesta obeležena sa FANCD2 predstavljaju fragilna mesta hromozoma (Naim i Rosselli, 2009).

Završna faza pokrenute signalne kaskade u odgovoru na oštećenje DNK je aktivacija već pomenutih, kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa. Ove neprogramirane pauze koje se aktiviraju kao odgovor na promene u genomu, sprečavaju dalje napredovanje kroz ćelijski ciklus i na taj način doprinose "umrežavanju" ćelijskog ciklusa sa popravkom DNK. Nakon što oštećenja budu popravljena, ćelije će proći kontrolnu tačku i nastaviti sa ćelijskim ciklusom, dok će u slučaju nepopravljivih oštećenja podleći apoptozi.

Pre 25 godina Kubbies i saradnici (1985) su proučavajući ćelijsku kinetiku pokazali da se poremećaj ćelijskog ciklusa kod FA ćelija sastoji od kašnjenja i zastoja krajem S ili početkom G2 faze ćelijskog ciklusa. Nekoliko godina kasnije utvrđeno je da su neispravni FA proteini uzrok akumulacije interlančanih unakrsnih veza i dvolančanih prekida DNK (Sala-Trepat *i sar.*, 2000; Sobeck *i sar.*, 2006) i da je stalno ili privremeno odlaganje napredovanja kroz ćelijski ciklus karakteristika ćelija koje sadrže takve lezije. Merenja protočnom citometrijom su potvrdila ova otkrića.

Analiza ćelijskog ciklusa u ovom istraživanju potvrdila je poteškoće FA ćelija u napredovanju kroz ćelijski ciklus. U poređenju sa kontrolnim ćelijama značajan deo ćelija se zaustavlja u G2/M fazi pre zračenja (26.30 %), dok se nakon zračenja većina ćelija trajno zaustavlja u G2/M (25 %-40 %). Visok procenat ćelija se uočava i u S fazi, posebno 5 h (47.21 %) i 24 h (29.97 %) nakon zračenja, što je praćeno smanjenjem broja ćelija koje ulaze u apoptozu (10 %-30 %). Sve BMF i kontrolne ćelije su u S fazi ćelijskog ciklusa pre zračenja, dok u svim periodima posle zračenja visok broj ćelija umire putem apoptoze, što je praćeno padom broja ćelija u S fazi. Procenat ćelija koje se nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa negativno je korelisan sa procentom ćelija koje umiru apoptozom.

Nakon tretmana DEB-om analiza ćelijskog ciklusa u FA grupi pokazala je da su ćelije ravnomerno distribuirane u sve tri faze; G0/G1, S i G2/M. Poređenjem sa kontrolnim ćelijama 24 h nakon tretmana utvrđeno je značajno više ćelija u G2/M fazi, dok su korelacionom analizom utvrđene negativne korelacije između procenta ćelija u G2/M fazi i onih u G0/G1, S i apoptozu. U BMF i kontrolnim ćelijama, nakon tretmana DEB-om, najveći procenat ćelija se uočava u S fazi na svim ispitivanim vremenima. Korelacionom analizom utvrđene su negativne korelacije između procenta ćelija u G2/M fazi sa procentom ćelija u S fazi i apoptozu.

Dobijeni rezultati su u skladu sa dosadašnjim otkrićima da FA ćelije generalno ispoljavaju poremećaj u ćelijskom ciklusu, kao i da FA ćelije kasne ili zastaju u G2/M ili kasnoj S fazi (Dutrillaux *i sar.*, 1982; Kubbies *i sar.*, 1985).

Prema literaturnim podacima postoje kontradiktorni zaključci o tome gde se tačno u okviru ćelijskog ciklusa odvija akumulacija oštećenih ćelija. Kada se FA ćelije tretiraju alkilirajućim agensima nakon završetka replikacije DNK, odnosno tokom G2 faze ćelijskog ciklusa, ne dolazi do zastoja i akumulacije ćelija u G2/M niti do povećanog broja hromozomskih prekida do narednog ćelijskog ciklusa (Akkari *i sar.*, 2001). Isto važi i za interlančane lezije nastale tokom G1 faze, koje ne dovode do zastoja u G1/S kontrolnoj tački ćelijskog ciklusa. Akkari i saradnici (2001) su stoga zaključili da se indukovana akumulacija FA ćelija odvija u kasnoj S fazi, iako ove ćelije imaju 4N sadržaj DNK koji ih formalno klasifikuje u G2 fazu ćelijskog ciklusa. Slični rezultati su utvrđeni u ovoj studiji; prvo primetno odstupanje i zastoj ćelija u

G2 fazi u FA ćelijama utvrđeno je tek 24 h nakon tretmana DEB-om, što potvrđuje da je za zastoj u G2/M kontrolnoj tački neophodno da ćelije prođu još jednu replikaciju. Istraživanja na FA ćelijama nakon tretmana alikilirajućim agensima su pokazala da se hromozomski prekidi i zastoj ćelijskog ciklusa uočavaju nakon što ćelije prođu kroz S fazu, odnosno da je DNK replikacija potrebna da podstakne zastoj u G2/M i prekide u hromozomima (Akkari *i sar.*, 2001). Za razliku od *wild type* ćelija, FA ćelijama je neophodno i do tri puta više vremena da bi prevazišle zastoj, što znači da su FA proteini na neki način uključeni u popravku interlančanih lezija tokom kasne S faze (Akkari *i sar.*, 2001). Osim toga, FA ćelije ne zaustavljaju replikaciju DNK nakon indukcije interlančanih unakrsnih veza, kao što se vidi kod *wild type* ćelija (Centurion *i sar.*, 2000; Sala-Trepat *i sar.*, 2000). FA ćelije nisu potpuno neefikasne u popravljanju unakrsnih lezija DNK, ali ih popravljaju približno 3 puta sporije od *wild type* ćelija, što sugerise da je primarni FA defekt u popravci ovih lezija tokom kasne S faze (Akkari *i sar.*, 2001). Drugim rečima, interlančane lezije se tolerišu sve dok ne dođe do zastoja replikativne viljuške i nastanka dvolančanih prekida.

Poznato je da alikilirajući agensi indukuju stvaranje interlančanih lezija, koje fizički blokiraju replikaciju, sprečavaju razdvajanje lanaca i nadalje uzrokuju zastoj DNK replikacije u S fazi ćelijskog ciklusa (Guervilly *i sar.*, 2008). Da bi se replikacija nastavila, potrebno je odstraniti nastalu leziju što se ostvaruje kompleksnim mehanizmom popravke koji uključuje FA proteine, polimeraze za translezionu sintezu (TLS) i proteine koji omogućavaju homologu rekombinaciju (Patel i Joenje, 2007). Zastoj replikacione viljuške aktivira ATR kinazu koja direktno ili preko efektorske kinaze CHK1 fosforiliše nekoliko proteina FA puta uključujući i FANCD2. Da bi uklanjanje interlančanog oštećenja bilo uspešno, neophodan je očuvan FA put. Prema našim rezultatima, ćelije pacijenata obolelih od FA, iako sadrže oštećenja DNK, prolaze kroz S fazu ćelijskog ciklusa i ulaze u G2/M. Budući da je FA put uključen u kontrolnu tačku koja indukuje zastoj u ranoj S fazi ili sredini S faze, rezultati ovog istraživanja ukazuju da su proteini FA puta direktno uključeni u aktivaciju i regulaciju S kontrolne tačke ćelijskog ciklusa, kao i popravku interlančanih lezija indukovanih alikilirajućim agensima. Uočeni zastoj u G2 fazi nastaje usled narušene DNK replikacije ili novih dvolančanih prekida nastalih kao

posledica poravke interlančanih unakrsnih veza. Poremećaj u bilo kom proteinu FA puta, a posebno u FANCD2 za posledicu ima gubitak nadzora nad oba gore pomenuta procesa. Nakon izlaganja alkilirajućim agensima neophodna je očuvana funkcija FANCD2 za adekvatno uspostavljanje kontrolne tačke unutar S faze, što se ostvaruje putem ATR-zavisne fosforilacije NBS1 i FANCD2 (Pichierri i Rosselli, 2004). U prilog tome ide i podatak da je u našoj studiji kod pacijenta FANCA (2229) uočeno zadržavanje ćelija u S fazi, u cilju popravke indukovanih interlančanih lezija, manji procenat ćelija koje se zadržavaju u G2/M i posledično visok procenat ćelija koje su podlegle apoptozi 24 sata nakon tretmana DEB-om.

Sa druge strane, utvrđeno je da γ -zračenje tokom G2 faze uzrokuje dvolančane prekide, koji nadalje uzrokuju zastoj u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Hong *i sar.*, 1994). Rezultati ovog istraživanja sugerišu da zastoj u G2 fazi ćelijskog ciklusa nakon zračenja nastaje kao posledica nagomilanih, nepopravljenih dvolančanih prekida tokom S faze ćelijskog ciklusa. Poređenjem dinamike ćelijskog ciklusa sa dinamikom oporavka indukovanih lezija 24 sata nakon zračenja, uočava se da 9.53 ± 3.19 , odnosno 9 puta više ćelija ostaje nepopravljeno u odnosu na stanje pre zračenja i čak 6 puta više u odnosu na kontrolu nakon zračenja. Istovremeno u S fazi se nalazi 30 % ćelija, a u G2 24 %, značajno više u poređenju sa BMF i kontrolnom grupom. Ako praznine i dvolančani prekidi koji se javljaju tokom replikacije, ostanu nepopravljeni do kraja S faze, moraju biti popravljani pre mitoze. Za homologu rekombinaciju tokom S i G2 faza, pomoću sestrinskih hromatida kao matrice, važno je da su sestrinske hromatide blizu jedna drugoj.

Polazeći od saznanja da se geni FA puta uključuju u cilju potpomaganja homologe rekombinacije i da je monoubikvitinizacija FANCD2 preko ATM, od ključne važnosti za normalan nivo popravke, utvrđeni zastoj može biti posledica poremećaja funkcije ovog gena. Tokom intra S faze, SMC1 (engl. *structural maintenance of chromosomes protein 1*) se asocira sa BRCA1 i FANCD2 i kroz ATM/ NBS1-zavisnu fosforilaciju odlaže napredovanje S faze (Kitagawa *i sar.*, 2004; Antoccia *i sar.*, 2008). Ćelije pacijenata obolelih od FA, iako sadrže oštećenja DNK, prolaze kroz S fazu ćelijskog ciklusa i ulaze u G2/M.

Postoje istraživanja u kojima autori tvrde da spontana ili indukovana akumulacija FA ćelija u G2 fazi ćelijskog ciklusa, ne odražava poremećaj odgovora ćelijskog ciklusa, već predstavlja sasvim normalan odgovor ćelija na nepopravljena oštećenja DNK (Heinrich *i sar.*, 1998). Dobijeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da FA ćelije imaju poremećen ćelijski ciklus, kao i da je normalna funkcija S/G2 kontrolne tačke od ključne važnosti za sprečavanje apoptoze ili pogrešne replikacije DNK (Zhu i Dutta, 2006). Što je najvažnije, zastoj oštećenih ćelija posredovan S/G2 kontrolnom tačkom sprečava njihov ulazak u mitozu, omogućava homologu DNK popravku i time smanjuje održavanje genetički štetnih lezija.

FANCD2 protein ima ulogu u regulaciji S kontrolne tačke ćelijskog ciklusa nakon zračenja. Kada se normalne ćelije izlože jonizujućem zračenju, AT proteinski produkt, ATM, fosforiliše FANCD2 na serinu 222, aktivirajući mehanizam koji je različit i nezavisan od monoubikvitinizacije indukovane alkilirajućim agensima (Taniguchi *i sar.*, 2002). FANCD2 time obezbeđuje vezu između FA proteinskog kompleksa i drugih puteva uključenih u DNK popravku funkcionisanjem na raskrsnici dva puta, jedan koji podrazumeva inaktivaciju efekta alkilirajućih agenasa FA proteinskim kompleksom i drugi koji podrazumeva ublažavanje efekata jonizujućeg zračenja od strane ATM (Tischkowitz i Hodgson, 2003). Dosadašnja istraživanja su utvrdila da FA ćelije deficijentne za FANCD2 ispoljavaju visok stepen osetljivosti na jonizujuće zračenje i imaju defekt u indukciji S kontrolne tačke u odgovoru na jonizujuće zračenje sličan onome koji se vidi kod pacijenata obolelih od ataksije-telangiektazije (Taniguchi *i sar.*, 2002). Ćelije deficijentne za ATM ili za neke supstrate ATM, kao što su CHK2, NBS1, SMC1, BRCA1 i FANCD2, ne zaustavljaju sintezu DNK posle izlaganja jonizujućem zračenju. Ovaj fenomen se naziva radiorezistentna DNK sinteza (RDS) (D'Andrea i Grompe, 2003).

Prema rezultatima ove studije, FA ćelije imaju poremećaj u toku replikacije DNK u kasnoj S fazi ćelijskog ciklusa, bilo zbog neispravne popravke oštećenja DNK u toku indukovane S faze ili usled radiorezistentne DNK sinteze, što na kraju rezultira u kašnjenju ćelijskog ciklusa, prolasku kroz S fazu i zaustavljanju u G2/M. Takođe, evidentno je da FA proteini aktivno učestvuju u regulaciji kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa i da poremećaji u njima mogu imati fatalne posledice po ćeliju. Kontrolne

tačke ćelijskog ciklusa povezane su sa mehanizmima popravke dvolančanih prekida DNK, kao što je homologa rekombinacija. Nesposobnost FA ćelija da održe G2 kontrolnu tačku može da se odnosi na poremećaje u popravci dvolančanih prekida DNK, a poremećaj u funkciji G2 kontrolne tačke može da bude primarni izvor genomske nestabilnosti u FA.

Odgovor kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa na oštećenja DNK indukovana jonizujućim zračenjem uključuje složenu mrežu genskih produkata koji saraduju u odlaganju napredovanja kroz međufazne prelaze ćelijskog ciklusa i povećavaju efikasnost popravke oštećene DNK (Fornace *i sar.*, 2002). Kada je oštećenje DNK nepopravljivo, kontrolne tačke inaktiviraju preživljavanje stalnim zastojsima ćelijskog ciklusa ili apoptozom. Posttranslacione modifikacije proteina ATM/ATR, CHK1/CHK2 i p53 u signalnim putevima su dobro proučene u odgovoru na jonizujućim zračenjem indukovana oštećenja (Abraham, 2003; Bartek i Lukas, 2007). Nekoliko studija je pokazalo da je ekspresija gena, uključujući i mnoge gene koji regulišu ćelijski ciklus, izrazito pogođena jonizujućim zračenjem (Cheung *i sar.*, 2003; Heinloth *i sar.*, 2003). Transkripciona regulacija gena kontrolisanih ćelijskim ciklusom može biti tesno povezana sa funkcijama kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa na mestu oštećenja DNK i promene u njihovoj ekspresiji mogu biti mehanizam za pokretanje zastoja ćelijskog ciklusa.

Ćelije zaustavljene u G2/M preživljavaju povredu i mogu se vratiti u ćelijski ciklus, zavisno od vremena slabljenja signala DNK oštećenja i posledičnog umanjenja ATM/ATR aktivnosti. Međutim, iako je opseg zastoja G2/M u korelaciji sa količinom početnog oštećenja DNK, studije u kojima su korišćene Artemis-deficijentne ćelije koje su defektne za popravku dvolančanih prekida kroz NHEJ, su pokazale da potpuna popravka DNK nije neophodna za ponovni ulazak u ćelijski ciklus (Lobrich i Jeggo, 2007). Takođe, ponovni ulazak oštećenih ćelija u ćelijski ciklus može inicirati onkogenezu tokom sledeće genotoksične povrede (Syljuasen, 2007). Ovo je u skladu sa činjenicom da su pacijenti oboleli od FA generalno podložni tumorima (Alter, 2003; Kutler *i sar.*, 2003; Rosenberg *i sar.*, 2003).

Analiza apoptotskog odgovora pokazala je da FA ćelije karakteriše nizak procenat ćelija u apoptozu, statistički značajno niži samo 30 minuta nakon zračenja u

poređenju sa kontrolom. Oštećene FA ćelije generalno podležu apoptozi, ali u znatno manjem procentu u odnosu na ćelije pacijenata obolelih od nenasledne aplazije kostne srži i kontrolnih fibroblasta.

Najmanji procenat ćelija u apoptozi se uočava 5 h nakon zračenja (10 %) dok je istovremeno gotovo 50 % ćelija u S fazi i 32 % u G2. Značajan procenat ćelija u apoptozi (33 %), uz istovremeno smanjenje procenta ćelija u S (30 %) i G2 (24 %) uočava se 24 h nakon zračenja. Rezultati ukazuju da je FA ćelijama neophodan drugi ćelijski ciklus koji kod fibroblasta traje 16.5 h, kako bi mogle bar delimično odstraniti oštećene ćelije apoptozom (Larsson i Wejde, 1992). Druga mogućnost je da ćelijski ciklus kasni onoliko dugo koliko je potrebno za popravku nastalih oštećenja. Nakon što oštećenja budu popravljena ćelije nastavljaju sa deobom.

Razne studije su ukazale na poremećenu regulaciju apoptoze u FA ćelijama (Rosselli, 1998). U studiji Ridet i saradnika (1997) zračenjem indukovana apoptoza je bila smanjena u limfoblastoidnim FA ćelijskim linijama ili su ćelije kasnile sa ulaskom u apoptozu. Prema ovim autorima, uočena razlika između FA i normalnih ćelija nastaje kao posledica puta kojim ćelije umiru; nekroza je glavni put eliminacije ozračenih FA ćelija nasuprot normalnim ćelijama kod kojih je apoptoza mehanizam uklanjanja oštećenih ćelija.

Analiza apoptotskog odgovora nakon tretmana DEB-om u FA grupi pokazala je da mali procenat ćelija ulazi u apoptozu čak i 24 h posle tretmana. Isti trend je uočen i u BMF i kontrolnoj grupi. Produžena G2 faza ćelijskog ciklusa ili zastoj u G2 je dodatno izražena posle tretmana alkilirajućim agensima kod FA ćelija (Kaiser *i sar.*, 1982). Budući da je p53 tumor supresor uključen u G1/S i G2/M kontrolne tačke ćelijskog ciklusa, očekivalo se da poremećaj kod FA ćelija može biti posledica direktne interakcije između FA i p53 proteina. Međutim, većina FA ćelija pokazuju normalnu indukciju proteina p53 nakon tretmana sa mitomicinom C ili drugim agensima koji oštećuju DNK. Štaviše, p53-zavisna apoptoza je normalna u FA ćelijama posle tretmana sa MMC. Osim toga, FA ćelije i normalne ćelije se ponašaju na sličan način u napredovanju ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu (Kruyt *i sar.*, 1996; Kupfer *i sar.*, 1997). Posmatrani zajedno, dosadašnji rezultati su pokazali da su

indukcija p53 i G1/S tranzicija normalne u FA ćelijama i da G2/M zastoj ne dolazi kroz direktnu interakciju između FA proteina i p53 (Levitus *i sar.*, 2006).

Dosadašnja istraživanja pružaju kontradiktorne podatke o apoptozi FA ćelija. Prema jednoj studiji, tretman četiri FA limfoblastoidne ćelijske linije sa MMC doveo je povećanja procenta ćelija u apoptozi (Kruyt *i sar.*, 1996), dok su druge studije pokazale više nivoe spontane apoptoze, niže nivoe posle γ -zračenja ili da nema razlike posle tretmana mitomicinom C (Rey *i sar.*, 1994; Rosselli *i sar.*, 1995; Ridet *i sar.*, 1997). Povećana apoptoza može da se odnosi na nemogućnost FA ćelija da poprave oštećenje ili na neispravne interakcije FA proteina sa drugim proteinima u putevima apoptoze (Pang *i sar.*, 2001).

Poređenjem dinamike ćelijskog ciklusa i apoptotskog odgovora FA ćelija nakon delovanja jonizujućeg zračenja i nakon tretmana DEB-om u ovoj studiji, najznačajnije razlike se uočavaju nakon 24 h. Nakon tretmana DEB-om čak 22 % ćelija se zadržava u G1 fazi, 33 % u G2, dok je procenat ćelija u apoptozi svega 18 % ćelija. Kod ozračenih FA ćelija većina se nalazi u S fazi (30 %), G2 (24 %) i apoptozi (33 %). Nakon zračenja FA ćelije podležu apoptozi, ali u manjem procentu, dok nakon tretmana DEB-om značajno kasne sa ulaskom u apoptozu.

Normalni ćelijski odgovor na zračenjem indukovano oštećenje DNK uključuje indukciju aktivnosti p53 proteina, koji deluje kao transkripcioni faktor i reguliše ekspresiju nekoliko gena uključenih u mehanizme regulacije ćelijskog ciklusa. Produkti aktiviranih gena međusobno grade komplekse koji zadržavaju ćeliju u G1 fazi. Zastoj u G1 fazi nakon delovanja jonizujućeg zračenja zavisi od ATM/p53 puta (Lavin i Shiloh, 1997). ATM se takođe smatra uzvodnim CHK1 putem i ima važnu ulogu u G2/M kontrolnom putu indukovanim DNK oštećenjem (Westphal, 1997). Popravka genetičkog materijala traje dok postoje određeni kompleksi; degradacijom kompleksa ćelije ulaze u S fazu. Zadržavanje ćelijskog ciklusa u G1 fazi omogućava da se aktiviranjem reparacije isprave ozlede na DNK na jednom broju ćelija, kao i eliminaciju izvesnog broja ćelija (interfazna ćelijska smrt), dok zadržavanje ćelijskog ciklusa u G2 fazi može imati značajnu ulogu u zaštiti ćelija od smrti (Teyssier *i sar.*, 1999). FANC proteini saraduju sa p53 i u G2 kontrolnoj tački, što znači da oni funkcionišu u različitim putevima koji se spajaju u cilju regulacije i održavanja G2

kontrolne tačke. Utvrđene alteracije p53 gena, nakon analize pojedinačnih nukleotidnih izmena, ipak ne isključuju njegovu ulogu u modulaciji apoptoze u slučajevima oštećenog FA puta nakon zračenja i biće predmet budućih istraživanja.

Smanjenje procenta ćelija u apoptozi ili kašnjenje sa ulaskom u apoptozu, sugeriše da ćelije pacijenta obolelih od FA, podležu alternativnim putevima ćelijske smrti. Brojne studije su ukazale na *in vivo* preosetljivost i zapaljenske procese kod FA pacijenta nakon tretmana jonizujućim zračenjem pred transplantaciju kostne srži, što sugeriše da bi nekroza mogla biti dominantan put umiranja FA ćelija. Niži procenat ćelija u apoptozi u odnosu na kontrolu utvrđen u našoj studiji, pokazuje da su FA geni uključeni u kontrolu apoptoze, ali da procenat ćelijskog pula koji će joj podleći zavisi kako od očuvanosti FA puta, tako i od međusobnih interakcija sa pro- i anti-apoptotskim faktorima.

U složenoj mreži puteva za popravku DNK procenjuje se da učestvuje preko 150 proteina. Izmene u genima koji ih kodiraju, kao što smo videli i kroz ovo istraživanje, dovode do genomske nestabilnosti i asocirane su sa raznim bolestima. Analiza pojedinačnih nukleotidnih izmena omogućila je praćenje malih varijacija u tim genima. Polimorfne varijante u genima čiji su proteini uključeni u puteve popravke DNK i regulaciju ćelijskog ciklusa, mogu objasniti međuindividualne razlike obolelih, poslužiti kao biomarkeri kliničkog odgovora i pružiti nadu za iznalaženje novih terapijskih tretmana koji bi omogućili izlečenje.

U ovoj studiji analizirane su nukleotidne izmene u 15 gena uključenih u puteve popravke DNK i 11 gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa.

O⁶metilguanin-DNK metiltransferaza (MGMT AGT) je protein koji učestvuje u uklanjanju adukata, O⁶-alkilguanina, indukovanih alkilirajućim agensima. O⁶-alkilguanin se smatra jednom od mutagenijih lezija zbog svoje sklonosti spajanja sa timinom tokom replikacije DNK (Tano *i sar.*, 1990). MGMT je pod kontrolom gena p53 i odgovoran je za rezistenciju na alkilirajuće agense. Razlike u nivoima ekspresije MGMT u normalnim tkivima mogu značajno doprineti riziku oboljevanja od kancera. U ovoj studiji analizirane su tri izmene u kodirajućem regionu ovog gena smeštenog na 10q26. Dva pacijenta BMF grupe (1850 i 1990) su heterozigoti za sinonimnu *Leu84Leu* izmenu. Za sada nema dostupnih podataka o značaju ove izmene u

hetrozigotnom obliku, ipak utvrđeno je da prelaskom C u T, T može biti meta isecanja od strane restrikcionog proteina Hpy188I (Otsuka *i sar.*, 1996). Isti pacijenti su heterozigoti za *missense* izmenu (*Leu115Phe*), a asocijativne studije su pokazale da homozigotni nosioci ove izmene imaju povećan rizik oboljevanja od kancera digestivnog trakta (Zhang *i sar.*, 2008). Dva pacijenta FA grupe (1823 i 2093) su hetrozigoti za *missense* izmenu *Ile174Val*, koja visoko koreliše sa povećanim rizikom od temozolomid-indukovane mijelosupresije. Temozolomid (TMF) je alikilirajući agens koji se koristi u lečenju kancera (Sylvester *i sar.*, 2010).

Analizom kodirajućeg regiona gena XRCC2 (engl. *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2*) čiji protein je neophodan za efikasan popravak dvolančanih prekida DNK, homologom rekombinacijom, utvrđena je *missense* izmena *Arg188His* u heterozigotnom obliku samo kod pacijenta 1823 iz FA grupe. Ova izmena, retka čak i kod heterozigotnih nosioca (0.056), asociirana je sa smanjenim rizikom oboljevanja od kancera dojke i ovarijuma (Loizidou *i sar.*, 2008).

XRCC3 (engl. *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*) je takođe uključen u puteve popravke i održavanje hromozomske stabilnosti. Svoju ulogu u homologoj rekombinaciji ostvaruje u kompleksu sa FANCD1/BRCA2-FANCD2-FANCG-XRCC3 (D1-D2-G-X3). Nadalje, XRCC3 učestvuje u grupisanju i stabilizaciji RAD51 na mestu nastale ozlede. Analizirane su tri izmene ovog gena smeštenog na hromozomu 14q32.3. Dva pacijenta iz FA grupe (1823 i 1866) i četiri pacijenta iz BMF grupe (1850, 2068, 2083 i 3370) su nosioci heterozigotne *missense* izmene *Thr241Met* (rs861539). Nukleotidna izmena C u T za posledicu ima povećanu incidencu oboljevanja od malignog melanoma kože (Winsey *i sar.*, 2000), međutim za sada nema dostupnih podataka o efektu kod heterozigotnih nosilaca. Analiza polimorfizama koju su sproveli Qiu i saradnici pokazala je da nosioci G alela u rs1799794 imaju nizak rizik za razvoj kancera pluća, dok G alel u rs1799796 štiti od kancera dojke (Qiu *i sar.*, 2010). Analizom naših pacijenata utvrđena je izmena A u G samo kod pacijenta 2093, dok su svi ostali FANCD2 pacijenti hetrozigotni nosioci (rs1799796).

Protein kodiran genom *XRCC4* (engl. *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4*) zajedno sa DNK ligazom 4 učestvuje u NHEJ putu popravke. Analizom izmena u nekodirajućem regionu gena (rs1805377) utvrđeno je da pacijent 1866 (FANCD2) nosi homozigotnu promenu G u A, dok je pacijent 1850 heterozigot za ovu nukleotidnu izmenu. Dosadašnje analize su utvrdile da supstitucija G/A za posledicu ima 1.33 puta veću incidencu obolevanja od kancera mokraćne bešike po alelnoj varijanti (Figueroa *i sar.*, 2007). Heterozigotni i homozigotni nosioci ove alteracije imaju povećanu incidencu obolevanja od kancera bubrežnih ćelija, homozigoti čak 1.76 puta češće obolevaju (Margulis *i sar.*, 2008). Homozigoti sa GG genotipom imaju manji rizik obolevanja od kancera pluća u poređenju sa pacijentima kod kojih su utvrđene alteracije (Tseng *i sar.*, 2009).

XRCC5 (engl. *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5*) je još jedan gen uključen u popravku dvolančanih prekida DNK. Ku80 protein kodiran ovim genom zajedno sa Ku70 (protein *XRCC6* gena) i kompleksom DNK ligaza 4-*XRCC4*, učestvuje u nehomologoj rekombinaciji. Analizirane su dve nukleotidne izmene; u 3' UTR regionu (rs1051677) i u egzonu 2 (rs2440). U FA grupi, kod pacijenta 1823, kao i kod 3 pacijenta BMF grupe (2068, 2083 i 3370) utvrđena je heterozigotna izmena u 3' UTR regionu. Dva pacijenta FANCD2 (1879 i 2093) i dva pacijenta BMF grupe (1850 i 1990) su nosioci heterozigotne izmene u kodirajućem regionu gena. Iako za sada ima malo dostupnih podataka o značaju ovih izmena, pretpostavlja se da povećavaju verovatnoću oboljevanja od mijeloma (Tewari *i sar.*, 2009).

Protein ATM (engl. *ataxia telangiectasia mutated*) je član fosfatilinozitol 3-kinazne familije proteina, ima ulogu u fosforilaciji drugih proteina uključenih u puteve popravke i/ili kontrolu ćelijskog ciklusa na mestu dvolančanog prekida DNK. U ovoj studiji analizirane su četiri nukleotidne izmene ATM gena. Promena T u C u nekodirajućem regionu gena (rs664677) utvrđena je kod 2093 (FANCD2), kod 1850 i 1990 nije utvrđena izmena, dok su preostali pacijenti heterozigotni nosioci izmene. Prema analizi Li i saradnika nosioci heterozigotne ili homozigotne izmene imaju lošiju prognozu i smanjenu stopu preživljavanja ako obole od kancera pankreasa (Li *i sar.*, 2006). Izmjena u kodirajućem regionu ATM gena (rs1800057) je *missense*

(*Pro1054Arg*), povećava rizik razvoja kancera prostate (Pugh *i sar.*, 2009), a utvrđena je u heterozigotnom obliku kod BMF pacijenata 1850, 2068 i 2083. Drugi polimorfizam u kodirajućem regionu (rs1801516) ima za posledicu *missense* izmenu (*Asp1853Asn*) koja 2.76 puta povećava rizik obolevanja od kancera pankreasa kod homozigotnih nosioca (Li *i sar.*, 2009). U našoj grupi pacijenata ova izmena nije pronađena, osim u heterozigotnom stanju. Polimorfizam u intronskom regionu (rs609429) asociran je sa smanjenim rizikom obolevanja od kancera pluća (Landi *i sar.*, 2006) i ova alteracija je pronađena u homozigotnom obliku samo kod pacijenta 2093. Asocijativnim studijama je utvrđeno da kombinacija polimorfizama *ATM/TP53* (rs1801516/rs664677/rs609429/rs1042522), odnosno GG/TC/CG/GC genotip visoko asocira sa zračenjem indukovanim kancerom štitne žlezde (Akulevich *i sar.*, 2009). Kombinacija ovakvog genotipa uočena je kod *FANCD2* pacijenata 1823 i 1866.

Analizirane su nukleotidne izmene u *BRCA1* (engl. *breast cancer 1, early onset*) genu. Proteini ovog gena, kao što smo već videli imaju važnu ulogu u popravci DNK, kontroli ćelijskog ciklusa i održavanju genomske stabilnosti. 25 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama je utvrđeno za ovaj gen, pojedinačna izmena u svakom od njih ima mali efekat, ali kumulativno povećavaju rizik obolevanja od kancera dojke (Milne, 2009). Analizirane su četiri *missense* alteracije u egzonu 10 *BRCA1* gena. Ni kod jednog od deset pacijenta nije utvrđena homozigotna *missense* izmena *Pro871Leu*, niti *Asp693Asn*. Dosadašnje studije su pokazale da nosioci izmene *Pro871Leu* imaju povećan rizik obolevanja od kancera cerviksa (Huo *i sar.*, 2009) i smanjen rizik obolevanja od glioblastoma (Chang *i sar.*, 2008), dok izmena *Asp693Asn* kod nosioca povećava rizik obolevanja od kancera dojke nakon izlaganja zračenju (Bhatti *i sar.*, 2008). Izmjena *Ser1040Asn* utvrđena je u heterozigotnom obliku samo kod 1850 pacijenta. Prema literaturnim podacima nosioci AA i AG genotipa imaju povećanu predispoziciju za kancer dojke (Friedman *i sar.*, 1994). Pacijent 2093 (*FANCD2*) je nosioc heterozigotne *missense* izmene *Gln356Arg*. Starije studije su povezivale ovu izmenu sa povećanim rizikom obolevanja od kancera dojke, međutim asocijacija nije potvrđena (Cox *i sar.*, 2005).

Protein kodiran *BARD 1* (engl. *BRCA1 associated RING domain 1*) genom, učestvuje zajedno sa *BRCA1* u popravci dvolančanih prekida i ubikvitinizaciji.

Takođe, BARD1 učestvuje i u apoptozi, vezivanjem i stabilizacijom p53. Analizirane su dve nukleotidne izmene u kodirajućem regionu ovog gena. Pacijenti 2229 (FANCA), 1823 (FANCD2) i 1990 (BMF) su homozigotni nosioci *missense* alteracije *Val507Met*, za koju je utvrđeno da povećava rizik oboljevanja od neuroblastoma (Capasso *i sar.*, 2009). Drugi analizirani polimorfizam, sinonimna izmena *His506His* osim u heterozigotnom obliku nije pronađena ni kod jednog pacijenta.

BRCA2 (engl. *breast cancer 2, early onset*, FANCD1) pripada familiji tumor supresorskih gena, kodira protein koji je uključen u "error-free" puteve popravke dvolančanih prekida. Analizirane su dve *missense* izmene u kodirajućim regionima gena koje visoko asociraju sa povećanim rizikom obolevanja od kancera dojke (Healey *i sar.*, 2000; Krupa *i sar.*, 2009). Analiza naših pacijenata pokazala je prisustvo *missense* izmene *Asn372His* kod pacijenta 1990, dok su 2068 i 2083 heterozigotni nosioci. Pacijent 1866 je nosilac heterozigotne izmene *Thr1915Met*.

FANCD2 protein je takođe uključen u puteve popravke DNK. Tokom S faze ćelijskog ciklusa monoubikvitinizovani FANCD2 protein specifično kolokalizuje sa replikacionim fokusima koji sadrže BRCA1, RAD51 i PCNA proteine i zajedno učestvuju u homologoj reparaciji. Rezultati analize su pokazali da svi FA i BMF pacijenti imaju nukleotidnu izmenu (rs3732974) u kodirajućem regionu gena FANCD2. Za sada nema literaturnih podataka o ovoj alteraciji koja je izuzetno retka čak i u heterozigotnom obliku (0.021).

LIG4 (engl. *ligase IV, DNA, ATP-dependent*) protein je ATP-zavisna DNK ligaza koja učestvuje u popravci dvolančanih prekida u NHEJ putu popravke i kao što je već pomenuto, gradi kompleks sa XRCC4. Analizirane su dve izmene u kodirajućem regionu ovog gena. Dosadašnje studije su pokazale da *missense* izmena *Ala3Val* u heterozigotnom obliku (CT) nosi dva puta manji rizik razvoja multiplog mijeloma. Druga izmena, takođe *missense* tipa (*Thr9Ile*), smanjuje rizik razvoja multiplog mijeloma kod hetreozigota (CT) za 1.5 puta, a kod homozigota (TT) čak 4 puta (Roddam *i sar.*, 2002). Najbolju prognozu imaju nosioci kombinacije izmena *Ala3Val-Thr9Ile* (CT-CT) i *Ala3Val-Thr9Ile* (CT-TT). Kombinacija izmena *Ala3Val-Thr9Ile* (CT-CT) utvrđena je kod pacijenata 1823 i 2093.

NBS1 (engl. *Nijmegen breakage syndrome 1*, nibrin), član MRE11/RAD50 kompleksa je još jedan važan učesnik puteva poravke dvolančanih prekida. Analizirane su dve izmene u kodirajućim regionima gena, sinonimna (*Leu34Leu*) i *missense* (*Glu185Gln*). Kod pacijenta 1879 utvrđena je sinonimna izmena G/A (*Leu34Leu*), međutim o ovoj alteraciji nedostaju literaturni podaci. Kod istog pacijenta utvrđena je i *missense* izmena *Glu185Gln* koja se dovodi u vezu sa povećanom incidencom obolevanja od meningioma (Rajaraman *i sar.*, 2010).

RAD51 ima ključnu ulogu u održavanju genomske celovitosti učestvujući u popravci dvolančanih prekida. Analizirana je izmena 135G/C (rs1801320) koja menja ekspresiju RAD51 i povećava rizik obolevanja od kancera dojke za 1.17 kod heterozigotnih i 3.18 puta kod homozigotnih nosioca BRCA2 mutacije (Antoniou *i sar.*, 2007). Kod naših pacijenata nije utvrđena izmena u homozigotnom stanju.

RAD52 i RAD54B su još dva gena čiji su proteini uključeni u popravku dvolančanih prekida homologom rekombinacijom. Nukleotidna izmena u RAD52 (rs11226) utvrđena je kod FANCD2 pacijenta 1879, kao i BMF pacijenata 1990 i 3370. Kod pacijenata 1823 (FANCD2) i 1990 utvrđena je i sinonimna izmena (*Asn250Asn*) u kodirajućem regionu RAD54B gena (rs2291439), ali za sada nema dostupnih podataka o značaju ove alteracije.

Protein CCND1 (engl. *cyclin D1*) učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa, posredstvom CDK kinaza. Sinonimna izmena *Pro241Pro* modifikuje rast ćelija, posebno ulazak i završetak S faze. Nalazi se u "splicing" regionu egzona 4, koji moduliše produkciju dva transkripta. Izmjena *Pro241Pro* utvrđena je kod pacijenata 1866 (FANCD2), 2068 i 2083 i u homozigotnom obliku asocirana je sa povećanim rizikom oboljevanja od kancera dojke, non-Hodžkinsonovog limfoma i kancera mokraćne bešike (Wang *i sar.*, 2006; Driver *i sar.*, 2008; Mason *i sar.*, 2009).

CCNH (engl. *cyclin H*) kao i CCND1 učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa. Analizom CCNH gena za *missense* izmenu *Val270Ala* utvrdili smo da je ova alteracija prisutna u heterozigotnom obliku kod 2229 (FANCA), dva pacijenta FANCD2 (1823, 2093) i 3370. Funkcionalna uloga supstitucije alanina valinom nije poznata, a dosadašnje analize ukazuju na asocijaciju sa smanjenim rizikom oboljevanja od hronične limfocitne leukemije (Enjuanes *i sar.*, 2008).

CDKN1B (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*, p27^{Kip1}) je jedan od gena čiji protein kontroliše napredovanje kroz ćelijski ciklus tokom G1 faze. Osnovna funkcija gena je u zaustavljanju ili usporavanju ćelijskog ciklusa. Mutacije u CDKN1B genu mogu dovesti do gubitka kontrole nad ćelijskim ciklusom i nekontrolisane ćelijske proliferacije (Toyoshima i Hunter, 1994). Supstitucija -79C/T u 5' UTR regionu iRNK (rs34330) koja za posledicu ima smanjenje transkripcije gena, utvrđena je kod pacijenta 2093, dok su preostala tri FANCD2 pacijenta heterozigotni nosioci izmene. Dosadašnje analize su pokazale visoku asocijaciju ovog polimorfizma sa oboljevanjem od kancera dojke, prostate i štitne žlezde (Chang *i sar.*, 2004; Driver *i sar.*, 2008; Landa *i sar.*, 2010).

Analizirane su izmene u nekodirajućim regionima dva gena (-rs); CDK7 (engl. *cyclin-dependent kinase 7*), ciklin zavisnoj kinazi koja čini sponu između regulacije transkripcije i ćelijskog ciklusa i u CHEK2 (engl. *checkpoint homolog (S. pombe)*), protein kinazi koja se aktivira u odgovoru na oštećenje DNK i reguliše zastoj ćelijskog ciklusa. Alteracije u ovim genima nisu utvrđene ni kod jednog pacijenta.

CDKN1A (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, p27^{Cip1}) gen koji kodira CDKN1A protein reguliše napredovanje kroz G1 fazu ćelijskog ciklusa. Ekspresija CDKN1A je pod kontrolom tumor supresora p53, preko koga i ostvaruje svoju ulogu u zastoju tokom G1. Pacijenti 1879, 2068 i 2083 su heterozigotni nosioci *missense* izmene *Ser31Arg* i izmene C/T u 3' UTR regionu gena. Analize ovih polimorfizama pokazale su povećanu incidencu oboljevanja od kancera pluća kod homozigotnih nosioca (Själänder *i sar.*, 1996), za heterozigotne nosioce međutim nema dostupnih literaturnih podataka.

CDKN2A (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, p16) je tumor supresor čiji protein ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa. Analizirane su tri izmene u kodirajućim regionima ovog gena. Izmene nisu utvrđene ni kod jednog pacijenta osim u heterozigotnom obliku. Prema literaturnim podacima *missense* izmena *Ala148Thr* kod homozigotnih nosioca povećava rizik oboljevanja od kancera kože (Pjanova *i sar.*, 2007). Druga dva polimorfizma povezana su sa povećanim rizikom oboljevanja od sekundarnih karcinome glave i vrata (Zhang *i sar.*, 2010).

RAD9A (engl. *RAD9 homolog A (S. pombe)*) gen kodira protein koji se grupiše zajedno sa ostalim proteinima na mestu oštećene DNK, a svoju funkciju ostvaruje pokretanjem "checkpoint" signalne kaskade. Analiza polimorfizma ovog gena u egzonu 11 (rs1064876) nije utvrdila promene kod naših pacijenata.

Ovim istraživanjem je obuhvaćena i analiza gena *TP53* (engl. *tumor protein p53*) i dva za njega vezana gena *TP53BP1* (engl. *tumor protein p53 binding protein 1*) i *TP53BP2* (engl. *tumor protein p53 binding protein 2*).

TP53 je tumor-supresor koji održava stabilnost genoma i predstavlja jednog od najvažnijih inicijatora apoptoze u odgovoru na oštećenje DNK. Analizirana je jedna nukleotidna izmena u kodirajućem regionu gena (rs1042522). Utvrđeno je da su tri pacijenta iz FA grupe (2229, 1823 i 1866) i pacijent 1850 heterozigotni nosioci *missense* izmene *Pro72Arg*. Asocijativne studije su pokazale da *72Arg* izoforma p53 proteina indukuje viši nivo apoptoze ćelija u odnosu na *72Pro* izoformu (Sullivan *i sar.*, 2004). Utvrđeno je da u odnosu na heterozigotne i *72Pro*, nosioci izmene *72Arg* imaju lošiju prognozu, karakteriše ih smanjen kapacitet reparacije DNK, povećana genomska nestabilnost i veća predispozicija ka razvoju kancera (Litviakov *i sar.*, 2010).

TP53BP1 je jedan osnovnih proteina "transducera" u signalnim kaskadama. U odgovoru na jonizujuće zračenje grupiše se na mestima dvolančanih prekida i interaguje sa fosforilisanim H2AX fokusima. Nadalje, neophodan je za akumulaciju p53 i regulaciju G2/M i intra S kontrolne tačke ćelijskog ciklusa. Analizirane su dve *missense* izmene u kodirajućim regionima gena. Izmjena *Asp353Glu* prisutna je samo kod pacijenta 1866 (FANCD2) i asociirana je sa povećanim rizikom oboljevanja od raka pluća (Truong *i sar.*, 2010). Izmjena *Gly417Ser* nije utvrđena ni kod jednog pacijenta, osim u heterozigotnom obliku. Za sada nema dostupnih podataka o značaju ove alteracije.

TP53BP2 učestvuje u regulaciji apoptoze interagujući sa ostalim članovima p53 familije. Kod naših pacijenata nije utvrđen polimorfizam u 3' UTR regionu, osim u heterozigotnom obliku, međutim o značaju ove alteracije nema dostupnih literaturnih podataka.

Rezultati analize pojedinačnih nukleotidnih izmena u genima za popravku DNK i regulaciju ćelijskog ciklusa, ukazuju na veću sklonost ka razvoju tumora obolelih od Fankonijeve anemije u odnosu na pacijente sa nenaslednom aplazijom kostne srži. Budući da je za neke nukleotidne izmene, koje su ispitivane u ovoj studiji, već potvrđena klinička asocijacija, pretpostavlja se da one mogu imati značajan uticaj na ukupnu genomsku nestabilnost, koja je jedna od osnovnih karakteristika pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije.

Na kraju, ovo istraživanje je još jednom potvrdilo stohastičku prirodu Fankonijeve anemije. Kod pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije postoji poremećaj u odgovoru na oštećenje DNK. Nakon indukcije oštećenja, ćelija odgovara kaskadom procesa, od modifikacije histona na mestu oštećenja, preko aktivacije kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa do organizacije hromatinskih enzima i proteina koji će učestvovati u popravci DNK. Poremećaj u bilo kom koraku može voditi narušavanju integriteta genoma i razvoju ovog oboljenja. Ovom studijom je posebno istaknuta uloga FA proteinskog kompleksa u odgovoru na oštećenje DNK. Neispravan FA proteinski kompleks na neadekvatan način deluje na remodeliranje hromatina, modulaciju signalnih puteva i utiče na sve ćelijske procese, stvarajući specifičan FA ćelijski fenotip. Sa druge strane, utvrđeno kašnjenje u kinetici popravke zračenjem indukovanih dvolančanih prekida u fibroblastima pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije, pruža mogućnost za novi pristup u diferencijalnoj dijagnostici FA ćelijskog fenotipa i prediktivnim testovima za transplanataciju kostne srži.

6. Zaključci

Na osnovu postavljenog cilja rada i dobijenih rezultata u ovom istraživanju mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Primarne ćelije (fibroblasti) poreklom od pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije indukovane dvolančane prekide popravljaju sa značajnim kašnjenjem u odnosu na ćelije pacijenata obolelih od nenasledne aplazije kostne srži i u odnosu na kontrolne ćelije
2. Kašnjenje u kinetici popravke zračenjem indukovanih dvolančanih prekida u FA fibroblastima može se smatrati merom konstitutivne radioosetljivosti i potvrđuje da je ovo poremećaj DNK reparacije
3. γ -H2AX fokusi 24 h nakon ozračivanja predstavljaju "reparativni kapacitet"- kapacitet ćelije za popravak dvolančanih prekida
4. Fankonijeva anemija se može razlikovati od ostalih sindroma aplazije kostne srži primenom γ -H2AX testa, te se ovaj test može koristiti za neposrednu dijagnozu FA ćelijskog fenotipa
5. Standarnim CB-MN testom je nemoguće proceniti konstitutivnu radioosetljivost FA pacijenata, ali uočeno povećanje indukovanih mikronukleusa u FA grupi u odnosu na BMF grupu, ipak ne isključuje primenu ovog testa kao dopunskog u dijagnostičke svrhe
6. FA ćelije imaju poremećaj u citokinezi i mitozu, a u odnosu na druge komplementacione grupe ćelije FANCA pacijenata u većem procentu umiru u mitozu putem mitotske katastrofe
7. Utvrđeni poremećaj u funkciji G2/M kontrolne tačke je jedan od primarnih izvora genomske nestabilnosti

8. FA ćelije pokazuju poremećaj u regulaciji apoptoze; nakon zračenja podležu apoptozi, ali u manjem procentu, dok nakon tretmana DEB-om značajno kasne sa ulaskom u apoptozu
9. Pojedinačne nukleotidne izmene ukazuju na lošiju prognozu i veću sklonost ka razvoju tumora kod pacijenata obolelih od Fankonijeve anemije u odnosu na pacijente obolele od nenasledne aplazije kostne srži

7. Literatura

- Abraham, R.T. *Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase*. *Bioessays* 2003;25:627-630.
- Adamo, A., Collis, S.J., Adelman, C.A., Silva, N., Horejsi, Z., Ward, J.D., Martinez-Perez, E., et al. *Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia*. *Molecular Cell* 2010;39:25-35.
- Akkari, Y.M., Bateman, R.L., Reifsteck, C.A., D'Andrea, A.D., Olson, S.B. and Grompe, M. *The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase*. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001;74:403-412.
- Akulevich, N.M., Saenko, V.A., Rogounovitch, T.I., Drozd, V.M., Lushnikov, E.F., Ivanov, V.K., Mitsutake, N., et al. *Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma*. *Endocrine-Related Cancer* 2009;16:491-503.
- Alter, B.P. *Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients*. *Radiotherapy and Oncology* 2002;62:345-347.
- Alter, B.P. *Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001*. *Cancer* 2003;97:425-440.
- Alter, B.P. *Inherited Bone Marrow Failure Syndromes*. In Nathan and Oski's *Hematology of Infancy and Childhood* 2003, 280, PA Saunders, Philadelphia
- Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., Tsarfaty, I., Shiloh, Y. and Rotman, G. *Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks*. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:38224-38230.
- Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D. and Taniguchi, T. *ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response*. *Genes and Development* 2004;18:1958-1963.
- Antocchia, A., Sakamoto, S., Matsuura, S., Tauchi, H. and Komatsu, K. *NBS1 prevents chromatid-type aberrations through ATM-dependent interactions with SMC1*. *Radiation Research* 2008;170:345-352.
- Antoniou, A.C., Sinilnikova, O.M., Simard, J., Leone, M., Dumont, M., Neuhausen, S.L., Struwing, J.P., et al. *RAD51 135G-->C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies*. *American Journal of Human Genetics* 2007;81:1186-1200.
- Auerbach, A.D. *Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test*. *Experimental Hematology* 1993;21:731-733.
- Auerbach, A.D. *Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis*. *Current Protocols in Human Genetics* 2003;Chapter 8:Unit 8 7.
- Auerbach, A.D. and Allen, R.G. *Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry*. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1991;51:1-12.
- Auerbach, A.D., Buchwald, M. and Joenje, H. *Fanconi Anemia*. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 2001, 753-768, McGraw-Hill, New York
- Aylon, Y. and Kupiec, M. *New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast*. *Mutation Research* 2004;566:231-248.

- Aylon, Y., Liefshitz, B. and Kupiec, M. *The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle.* EMBO Journal 2004;23:4868-4875.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation.* Nature 2003;421:499-506.
- Banath, J.P., Fushiki, M. and Olive, P.L. *Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation.* International Journal of Radiation Biology 1998;73:649-660.
- Banath, J.P., Klovov, D., MacPhail, S.H., Banuelos, C.A. and Olive, P.L. *Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions.* BMC Cancer 2010;10:4.
- Banath, J.P., Macphail, S.H. and Olive, P.L. *Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines.* Cancer Research 2004;64:7144-7149.
- Banath, J.P. and Olive, P.L. *Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks.* Cancer Research 2003;63:4347-4350.
- Barber, L.J. and Boulton, S.J. *BRCA1 ubiquitylation of CtIP: Just the tIP of the iceberg?* DNA Repair (Amst) 2006;5:1499-1504.
- Barquinero, J.F., Barrios, L., Ribas, M., Egozcue, J. and Caballin, M.R. *Cytogenetic sensitivity of three Fanconi anemia heterozygotes to bleomycin and ionizing radiation.* Cancer Genetics and Cytogenetics 2001;124:80-83.
- Bartek, J. and Lukas, J. *DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation.* Current Opinion in Cell Biology 2007;19:238-245.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J. and Lukas, J. *Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1.* Journal of Cell Biology 2005;170:201-211.
- Bennett, E.J. and Harper, J.W. *DNA damage: ubiquitin marks the spot.* Nature Structural & Molecular Biology 2008;15:20-22.
- Bermejo, R., Doksani, Y., Capra, T., Katou, Y.M., Tanaka, H., Shirahige, K. and Foiani, M. *Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation.* Genes and Development 2007;21:1921-1936.
- Bhatti, P., Struewing, J.P., Alexander, B.H., Hauptmann, M., Bowen, L., Mateus-Pereira, L.H., Pineda, M.A., et al. *Polymorphisms in DNA repair genes, ionizing radiation exposure and risk of breast cancer in U.S. Radiologic technologists.* International Journal of Cancer 2008;122:177-182.
- Bogliolo, M., Lyakhovich, A., Callen, E., Castella, M., Cappelli, E., Ramirez, M.J., Creus, A., et al. *Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability.* EMBO Journal 2007;26:1340-1351.
- Bouquet, F., Muller, C. and Salles, B. *The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage.* Cell Cycle 2006;5:1116-1122.

- Branzei, D. and Foiani, M. *The DNA damage response during DNA replication*. Current Opinion in Cell Biology 2005;17:568-575.
- Branzei, D. and Foiani, M. *The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation*. Experimental Cell Research 2006;312:2654-2659.
- Branzei, D. and Foiani, M. *Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks*. DNA Repair (Amst) 2007;6:994-1003.
- Branzei, D. and Foiani, M. *Regulation of DNA repair throughout the cell cycle*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2008;9:297-308.
- Brown, E.J. and Baltimore, D. *Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance*. Genes and Development 2003;17:615-628.
- Bunting, S.F. and Nussenzweig, A. *Dangerous liaisons: Fanconi anemia and toxic nonhomologous end joining in DNA crosslink repair*. Molecular Cell 2010;39:164-166.
- Burma, S., Chen, B.P. and Chen, D.J. *Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity*. DNA Repair (Amst) 2006;5:1042-1048.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D.J. *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. Journal of Biological Chemistry 2001;276:42462-42467.
- Camelo, R.M., Kehdy, F.S., Salas, C.E. and Lopes, M.T. *Amifostine protection against mitomycin-induced chromosomal breakage in fanconi anaemia lymphocytes*. Molecules 2008;13:1759-1772.
- Cantor, S.B., Bell, D.W., Ganesan, S., Kass, E.M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D.C., et al. *BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function*. Cell 2001;105:149-160.
- Capasso, M., Devoto, M., Hou, C., Asgharzadeh, S., Glessner, J.T., Attiyeh, E.F., Mosse, Y.P., et al. *Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma*. Nature Genetics 2009;41:718-723.
- Casado, J.A., Nunez, M.I., Segovia, J.C., Ruiz de Almodovar, J.M. and Bueren, J.A. *Non-homologous end-joining defect in fanconi anemia hematopoietic cells exposed to ionizing radiation*. Radiation Research 2005;164:635-641.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., et al. *Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks*. Nature Cell Biology 2003;5:675-679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., et al. *Genomic instability in mice lacking histone H2AX*. Science 2002;296:922-927.
- Centurion, S.A., Kuo, H.R. and Lambert, W.C. *Damage-resistant DNA synthesis in Fanconi anemia cells treated with a DNA cross-linking agent*. Experimental Cell Research 2000;260:216-221.
- Chan, K.L., Palmai-Pallag, T., Ying, S. and Hickson, I.D. *Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis*. Nature Cell Biology 2009;11:753-760.
- Chandra, S., Levran, O., Jurickova, I., Maas, C., Kapur, R., Schindler, D., Henry, R., et al. *A rapid method for retrovirus-mediated identification of*

- complementation groups in Fanconi anemia patients.* Molecular Therapy 2005;12:976-984.
- Chang, B.L., Zheng, S.L., Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Turner, A., Li, G., Walsh, P.C., et al. *A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer.* Cancer Research 2004;64:1997-1999.
- Chang, J.S., Yeh, R.F., Wiencke, J.K., Wiemels, J.L., Smirnov, I., Pico, A.R., Tihan, T., et al. *Pathway analysis of single-nucleotide polymorphisms potentially associated with glioblastoma multiforme susceptibility using random forests.* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 2008;17:1368-1373.
- Chapman, J.R. and Jackson, S.P. *Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage.* EMBO Rep 2008;9:795-801.
- Chen, Q., Van der Sluis, P.C., Boulware, D., Hazlehurst, L.A. and Dalton, W.S. *The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells.* Blood 2005;106:698-705.
- Cheung, V.G., Conlin, L.K., Weber, T.M., Arcaro, M., Jen, K.Y., Morley, M. and Spielman, R.S. *Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells.* Nature Genetics 2003;33:422-425.
- Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S. and Lieberman, J. *gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair.* Molecular Cell 2005;20:801-809.
- Chun, H.H. and Gatti, R.A. *Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype.* DNA Repair (Amst) 2004;3:1187-1196.
- Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A. and Parker, A.R. *The life and death of DNA-PK.* Oncogene 2005;24:949-961.
- Couch, F.J., Johnson, M.R., Rabe, K., Boardman, L., McWilliams, R., de Andrade, M. and Petersen, G. *Germ line Fanconi anemia complementation group C mutations and pancreatic cancer.* Cancer Research 2005;65:383-386.
- Cox, D.G., Kraft, P., Hankinson, S.E. and Hunter, D.J. *Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer.* Breast Cancer Research 2005;7:R171-175.
- D'Andrea, A.D. and Grompe, M. *The Fanconi anaemia/BRCA pathway.* Nature Reviews: Cancer 2003;3:23-34.
- Dasika, G.K., Lin, S.C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A. and Lee, E.Y. *DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis.* Oncogene 1999;18:7883-7899.
- Deribe, Y.L., Pawson, T. and Dikic, I. *Post-translational modifications in signal integration.* Nature Structural & Molecular Biology 2010;17:666-672.
- Digweed, M., Rothe, S., Demuth, I., Scholz, R., Schindler, D., Stumm, M., Grompe, M., et al. *Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia.* Carcinogenesis 2002;23:1121-1126.
- Digweed, M. and Sperling, K. *Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks.* DNA Repair (Amst) 2004;3:1207-1217.

- Djuzenova, C., Flentje, M. and Plowman, P.N. *Radiation response in vitro of fibroblasts from a fanconi anemia patient with marked clinical radiosensitivity*. *Strahlentherapie und Onkologie* 2004;180:789-797.
- Djuzenova, C.S. and Flentje, M. *Characterization of Fanconi anemia fibroblasts in terms of clonogenic survival and DNA damage assessed by the Comet assay*. *Medical Science Monitor* 2002;8:BR421-430.
- Djuzenova, C.S., Rothfuss, A., Oppitz, U., Spelt, G., Schindler, D., Hoehn, H. and Flentje, M. *Response to X-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay*. *Laboratory Investigation* 2001;81:185-192.
- Driver, K.E., Song, H., Lesueur, F., Ahmed, S., Barbosa-Morais, N.L., Tyrer, J.P., Ponder, B.A., et al. *Association of single-nucleotide polymorphisms in the cell cycle genes with breast cancer in the British population*. *Carcinogenesis* 2008;29:333-341.
- Duckworth-Rysiecki, G. and Taylor, A.M. *Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients*. *Cancer Research* 1985;45:416-420.
- Duckworth-Rysiecki, G. and Taylor, A.M.R. *Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients*. *Cancer Research* 1985;45:416-420.
- Dutrillaux, B., Aurias, A., Dutrillaux, A.M., Buriot, D. and Prieur, M. *The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia*. *Human Genetics* 1982;62:327-332.
- Eguchi-Kasai, K., Kosaka, T., Sato, K. and Kaneko, I. *Reparability of DNA double-strand breaks and radiation sensitivity in five mammalian cell lines*. *International Journal of Radiation Biology* 1991;59:97-104.
- Elstein, K.H., Thomas, D.J. and Zucker, R.M. *Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis*. *Cytometry* 1995;21:170-176.
- Enjuanes, A., Benavente, Y., Bosch, F., Martin-Guerrero, I., Colomer, D., Perez-Alvarez, S., Reina, O., et al. *Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia*. *Cancer Research* 2008;68:10178-10186.
- Esik, O., Csere, T., Stefanits, K., Szakall, S., Jr., Lengyel, Z., Safrany, G., Vonoczky, K., et al. *Increased metabolic activity in the spinal cord of patients with long-standing Lhermitte's sign*. *Strahlentherapie und Onkologie* 2003;179:690-693.
- Fabbro, M., Savage, K., Hobson, K., Deans, A.J., Powell, S.N., McArthur, G.A. and Khanna, K.K. *BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage*. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:31251-31258.
- Falck, J., Coates, J. and Jackson, S.P. *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. *Nature* 2005;434:605-611.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J. and Bartek, J. *The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways*. *Nature Genetics* 2002;30:290-294.
- Fenech, M. *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations*. *Mutation Research* 1993;285:35-44.

- Fenech, M. *Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death*. Mutation Research 2006;600:58-66.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A. and Nussenzweig, A. *Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors*. Cell Cycle 2003;2:426-427.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., et al. *DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1*. Nature Cell Biology 2002;4:993-997.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. and Nussenzweig, A. *H2AX: the histone guardian of the genome*. DNA Repair (Amst) 2004;3:959-967.
- Figueroa, J.D., Malats, N., Rothman, N., Real, F.X., Silverman, D., Kogevinas, M., Chanock, S., et al. *Evaluation of genetic variation in the double-strand break repair pathway and bladder cancer risk*. Carcinogenesis 2007;28:1788-1793.
- Fornace, A.J., Jr., Amundson, S.A., Do, K.T., Meltzer, P., Trent, J. and Bittner, M. *Stress-gene induction by low-dose gamma irradiation*. Military Medicine 2002;167:13-15.
- Franchitto, A., Oshima, J. and Pichierri, P. *The G2-phase decatenation checkpoint is defective in Werner syndrome cells*. Cancer Research 2003;63:3289-3295.
- Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., et al. *H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations*. Molecular Cell 2006;21:201-214.
- Friedman, L.S., Ostermeyer, E.A., Szabo, C.I., Dowd, P., Lynch, E.D., Rowell, S.E. and King, M.C. *Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families*. Nature Genetics 1994;8:399-404.
- Friesner, J.D., Liu, B., Culligan, K. and Britt, A.B. *Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related*. Molecular Biology of the Cell 2005;16:2566-2576.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., et al. *Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway*. Molecular Cell 2001;7:249-262.
- Gennery, A.R., Slatter, M.A., Bhattacharya, A., Barge, D., Haigh, S., O'Driscoll, M., Coleman, R., et al. *The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia*. Clinical Immunology 2004;113:214-219.
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., et al. *MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint*. Nature 2003;421:952-956.
- Groth, A., Corpet, A., Cook, A.J., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J. and Almouzni, G. *Regulation of replication fork progression through histone supply and demand*. Science 2007;318:1928-1931.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A. and Almouzni, G. *Chromatin challenges during DNA replication and repair*. Cell 2007;128:721-733.

- Guardavaccaro, D., Corrente, G., Covone, F., Micheli, L., D'Agnano, I., Starace, G., Caruso, M., et al. *Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription.* Molecular and Cellular Biology 2000;20:1797-1815.
- Guervilly, J.H., Mace-Aime, G. and Rosselli, F. *Loss of CHK1 function impedes DNA damage-induced FANCD2 monoubiquitination but normalizes the abnormal G2 arrest in Fanconi anemia.* Human Molecular Genetics 2008;17:679-689.
- Haber, J.E. *Partners and pathways repairing a double-strand break.* Trends in Genetics 2000;16:259-264.
- Hanasoge, S. and Ljungman, M. *H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase.* Carcinogenesis 2007;28:2298-2304.
- Healey, C.S., Dunning, A.M., Teare, M.D., Chase, D., Parker, L., Burn, J., Chang-Claude, J., et al. *A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability.* Nature Genetics 2000;26:362-364.
- Heinloth, A.N., Shackelford, R.E., Innes, C.L., Bennett, L., Li, L., Amin, R.P., Sieber, S.O., et al. *ATM-dependent and -independent gene expression changes in response to oxidative stress, gamma irradiation, and UV irradiation.* Radiation Research 2003;160:273-290.
- Heinrich, M.C., Hoatlin, M.E., Zigler, A.J., Silvey, K.V., Bakke, A.C., Keeble, W.W., Zhi, Y., et al. *DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function.* Blood 1998;91:275-287.
- Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M., Orr, A.I., Reaper, P.M., et al. *Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM.* Cancer Research 2004;64:9152-9159.
- Hirano, T. *At the heart of the chromosome: SMC proteins in action.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006;7:311-322.
- Hirsch, B., Shimamura, A., Moreau, L., Baldinger, S., Hag-alshiekh, M., Bostrom, B., Sencer, S., et al. *Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood.* Blood 2004;103:2554-2559.
- Hoeijmakers, J.H. *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.* Nature 2001;411:366-374.
- Hong, J.H., Gatti, R.A., Huo, Y.K., Chiang, C.S. and McBride, W.H. *G2/M-phase arrest and release in ataxia telangiectasia and normal cells after exposure to ionizing radiation.* Radiation Research 1994;140:17-23.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., et al. *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia.* Science 2002;297:606-609.
- Huang, X., Tran, T., Zhang, L., Hatcher, R. and Zhang, P. *DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102:1065-1070.

- Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B. and Chen, J. *RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly*. Cell 2007;131:901-914.
- Huo, X., Lu, C., Huang, X., Hu, Z., Jin, G., Ma, H., Wang, X., et al. *Polymorphisms in BRCA1, BRCA1-interacting genes and susceptibility of breast cancer in Chinese women*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2009;135:1569-1575.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A.R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., et al. *Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation*. Cytogenetic and Genome Research 2004;104:14-20.
- ISCN. *An International System for Cytogenetic Nomenclature*. 2005, Karger Basel.
- Iwabuchi, K., Basu, B.P., Kysela, B., Kurihara, T., Shibata, M., Guan, D., Cao, Y., et al. *Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA*. Journal of Biological Chemistry 2003;278:36487-36495.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J. and Jackson, S.P. *ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks*. Nature Cell Biology 2006;8:37-45.
- Jiricny, J. *The multifaceted mismatch-repair system*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006;7:335-346.
- Joenje, H. and Patel, K.J. *The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia*. Nature Reviews: Genetics 2001;2:446-457.
- Joksić, G. *Relationship between Chromosome Aberrations and Micronuclei in Circulating Lymphocytes after Fractionated Irradiation in vitro*. The Korean Journal of Genetics 2004;26:227-234.
- Joksić, G., Nikolić, M. and Spasojević-Tišma, V. *Radiosensitivity of different aged human lymphocytes following electron irradiation in vitro*. Neoplasma 1997;44:117-121.
- Joksić, G., Pajović, S.B., Stanković, M., Pejić, S., Kasapović, J., Cuttone, G., Calonghi, N., et al. *Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation in vitro*. Cellular and Molecular Life Sciences 2000;57:842-850.
- Kaiser, T.N., Lojewski, A., Dougherty, C., Juergens, L., Sahar, E. and Latt, S.A. *Flow cytometric characterization of the response of Fanconi's anemia cells to mitomycin C treatment*. Cytometry 1982;2:291-297.
- Kalb, R., Duerr, M., Wagner, M., Herterich, S., Gross, M., Digweed, M., Joenje, H., et al. *Lack of sensitivity of primary Fanconi's anemia fibroblasts to UV and ionizing radiation*. Radiation Research 2004;161:318-325.
- Kalb, R., Neveling, K., Hoehn, H., Schneider, H., Linka, Y., Batish, S.D., Hunt, C., et al. *Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype*. American Journal of Human Genetics 2007;80:895-910.
- Kalb, R., Neveling, K., Nanda, I., Schindler, D. and Hoehn, H. *Fanconi anemia: causes and consequences of genetic instability*. Genome Dynamics 2006;1:218-242.

- Kao, J., Milano, M.T., Javaheri, A., Garofalo, M.C., Chmura, S.J., Weichselbaum, R.R. and Kron, S.J. *gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy*. *Current Cancer Drug Targets* 2006;6:197-205.
- Karagiannis, T.C. and El-Osta, A. *Chromatin modifications and DNA double-strand breaks: the current state of play*. *Leukemia* 2007;21:195-200.
- Kee, Y. and D'Andrea, A.D. *Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability*. *Genes and Development* 2010;24:1680-1694.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P. *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection*. *Nature Genetics* 2001;27:247-254.
- Kim, J.S., Krasieva, T.B., Kurumizaka, H., Chen, D.J., Taylor, A.M. and Yokomori, K. *Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells*. *Journal of Cell Biology* 2005;170:341-347.
- Kim, Y., Lach, F.P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A.D. and Smogorzewska, A. *Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia*. *Nature Genetics* 2010;43:142-146.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C. and Iliakis, G. *Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. *Nucleic Acids Research* 2008;36:5678-5694.
- Kitagawa, R., Bakkenist, C.J., McKinnon, P.J. and Kastan, M.B. *Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway*. *Genes and Development* 2004;18:1423-1438.
- Klokov, D., MacPhail, S.M., Banath, J.P., Byrne, J.P. and Olive, P.L. *Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays*. *Radiotherapy and Oncology* 2006;80:223-229.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., et al. *NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain*. *Current Biology* 2002;12:1846-1851.
- Kouzarides, T. *Chromatin modifications and their function*. *Cell* 2007;128:693-705.
- Krupa, R., Sliwinski, T., Morawiec, Z., Pawlowska, E., Zadrozny, M. and Blasiak, J. *Association between polymorphisms of the BRCA2 gene and clinical parameters in breast cancer*. *Experimental Oncology* 2009;31:250-251.
- Kruyt, F.A., Dijkmans, L.M., van den Berg, T.K. and Joenje, H. *Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines*. *Blood* 1996;87:938-948.
- Kubbies, M., Schindler, D., Hoehn, H., Schinzel, A. and Rabinovitch, P.S. *Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells*. *American Journal of Human Genetics* 1985;37:1022-1030.
- Kupfer, G.M., Yamashita, T., Naf, D., Suliman, A., Asano, S. and D'Andrea, A.D. *The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2*. *Blood* 1997;90:1047-1054.
- Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P.F., Hanenberg, H., et al. *A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)*. *Blood* 2003;101:1249-1256.

- Landa, I., Montero-Conde, C., Malanga, D., De Gisi, S., Pita, G., Leandro-Garcia, L.J., Inglada-Perez, L., et al. *Allelic variant at -79 (C>T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels.* Endocrine-Related Cancer 2010;17:317-328.
- Landi, S., Gemignani, F., Canzian, F., Gaborieau, V., Barale, R., Landi, D., Szeszenia-Dabrowska, N., et al. *DNA repair and cell cycle control genes and the risk of young-onset lung cancer.* Cancer Research 2006;66:11062-11069.
- Larsson, O. and Wejde, J. *Dolichol delays G1-arrest for one cell cycle in human fibroblasts subjected to depletion of serum or mevalonate.* Journal of Cell Science 1992;103 (Pt 4):1065-1072.
- Lavin, M.F. and Shiloh, Y. *The genetic defect in ataxia-telangiectasia.* Annual Review of Immunology 1997;15:177-202.
- Lee, S.E., Mitchell, R.A., Cheng, A. and Hendrickson, E.A. *Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle.* Molecular and Cellular Biology 1997;17:1425-1433.
- Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, P.L., et al. *Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch.* DNA Repair (Amst) 2007;6:891-899.
- Leskovac, A., Vujic, D., Guc-Scekic, M., Petrovic, S., Joksic, I., Slijepcevic, P. and Joksic, G. *Fanconi anemia is characterized by delayed repair kinetics of DNA double-strand breaks.* Tohoku Journal of Experimental Medicine 2010;221:69-76.
- Lettier, G., Feng, Q., de Mayolo, A.A., Erdeniz, N., Reid, R.J., Lisby, M., Mortensen, U.H., et al. *The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in S. cerevisiae.* PLoS Genet 2006;2:e194.
- Levitus, M., Joenje, H. and de Winter, J.P. *The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance.* Cell Oncology 2006;28:3-29.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., et al. *The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J.* Nature Genetics 2005;37:934-935.
- Levrano, O., Attwooll, C., Henry, R.T., Milton, K.L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S.D., et al. *The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia.* Nature Genetics 2005;37:931-933.
- Li, D., Frazier, M., Evans, D.B., Hess, K.R., Crane, C.H., Jiao, L. and Abbruzzese, J.L. *Single nucleotide polymorphisms of RecQ1, RAD54L, and ATM genes are associated with reduced survival of pancreatic cancer.* Journal of Clinical Oncology 2006;24:1720-1728.
- Li, D., Suzuki, H., Liu, B., Morris, J., Liu, J., Okazaki, T., Li, Y., et al. *DNA repair gene polymorphisms and risk of pancreatic cancer.* Clinical Cancer Research 2009;15:740-746.
- Lieber, M.R. *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining.* Journal of Biological Chemistry 2008;283:1-5.
- Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A., Wittenberg, C. and Russell, P. *Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to*

- control double-strand break repair by homologous recombination. Molecular Cell* 2007;28:134-146.
- Limoli, C.L., Giedzinski, E., Bonner, W.M. and Cleaver, J.E. *UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2002;99:233-238.
- Litviakov, N.V., Denisov, E.V., Takhauov, R.M., Karpov, A.B., Skobel'skaja, E.V., Vasil'eva, E.O., Goncharik, O.O., et al. *Association between TP53 gene ARG72PRO polymorphism and chromosome aberrations in human cancers. Molecular Carcinogenesis* 2010;49:521-524.
- Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J. and Huang, J. *FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. Science* 2010;329:693-696.
- Llorente, B. and Symington, L.S. *The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. Molecular and Cellular Biology* 2004;24:9682-9694.
- Lobrich, M. and Jeggo, P.A. *The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. Nature Reviews: Cancer* 2007;7:861-869.
- Loizidou, M.A., Michael, T., Neuhausen, S.L., Newbold, R.F., Marcou, Y., Kakouri, E., Daniel, M., et al. *Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. Breast Cancer Research and Treatment* 2008;112:575-579.
- Lou, Z., Chen, B.P., Asaithamby, A., Minter-Dykhouse, K., Chen, D.J. and Chen, J. *MDC1 regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage. Journal of Biological Chemistry* 2004;279:46359-46362.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., et al. *MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. Molecular Cell* 2006;21:187-200.
- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., et al. *Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. EMBO Journal* 2004;23:2674-2683.
- Lyakhovich, A. and Surrallés, J. *New roads to FA/BRCA pathway: H2AX. Cell Cycle* 2007;6:1019-1023.
- MacPhail, S.H., Banath, J.P., Yu, Y., Chu, E. and Olive, P.L. *Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. Radiation Research* 2003;159:759-767.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C. and Lukas, J. *RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. Cell* 2007;131:887-900.
- Marcou, Y., D'Andrea, A., Jeggo, P.A. and Plowman, P.N. *Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. Radiotherapy and Oncology* 2001;60:75-79.
- Margulis, V., Lin, J., Yang, H., Wang, W., Wood, C.G. and Wu, X. *Genetic susceptibility to renal cell carcinoma: the role of DNA double-strand break*

- repair pathway*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2008;17:2366-2373.
- Marti, T.M., Hefner, E., Feeney, L., Natale, V. and Cleaver, J.E. *H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2006;103:9891-9896.
- Mason, R.A., Morlock, E.V., Karagas, M.R., Kelsey, K.T., Marsit, C.J., Schned, A.R. and Andrew, A.S. *EGFR pathway polymorphisms and bladder cancer susceptibility and prognosis*. *Carcinogenesis* 2009;30:1155-1160.
- McKinnon, P.J. *ATM and ataxia telangiectasia*. *EMBO Rep* 2004;5:772-776.
- Medvedeva, N.G., Panyutin, I.V., Panyutin, I.G. and Neumann, R.D. *Phosphorylation of histone H2AX in radiation-induced micronuclei*. *Radiation Research* 2007;168:493-498.
- Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., et al. *A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia*. *Nature Genetics* 2003;35:165-170.
- Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T.R., Bier, P., Steltenpool, J., et al. *A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M*. *Nature Genetics* 2005;37:958-963.
- Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M.K., Joenje, H., Hoatlin, M.E., et al. *A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome*. *Molecular and Cellular Biology* 2003;23:3417-3426.
- Milne, R.L. *Variants in the ATM gene and breast cancer susceptibility*. *Genome Medicine* 2009;1:12.
- Minter-Dykhouse, K., Ward, I., Huen, M.S., Chen, J. and Lou, Z. *Distinct versus overlapping functions of MDC1 and 53BP1 in DNA damage response and tumorigenesis*. *Journal of Cell Biology* 2008;181:727-735.
- Mirzayans, R., Severin, D. and Murray, D. *Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2006;66:1498-1505.
- Misteli, T. *Beyond the sequence: cellular organization of genome function*. *Cell* 2007;128:787-800.
- Mohseni-Meybodi, A., Mozdarani, H. and Mozdarani, S. *DNA damage and repair of leukocytes from Fanconi anaemia patients, carriers and healthy individuals as measured by the alkaline comet assay*. *Mutagenesis* 2009;24:67-73.
- Montes de Oca, R., Andreassen, P.R., Margossian, S.P., Gregory, R.C., Taniguchi, T., Wang, X., Houghtaling, S., et al. *Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin*. *Blood* 2005;105:1003-1009.
- Morgan, W.F., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, M.I., Limoli, C.L. and Ponnaiya, B. *DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability*. *Mutation Research* 1998;404:125-128.

- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E. and Shen, X. *INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair*. *Cell* 2004;119:767-775.
- Muller, W.U., Nusse, M., Miller, B.M., Slavotinek, A., Viaggi, S. and Streffer, C. *Micronuclei: a biological indicator of radiation damage*. *Mutation Research* 1996;366:163-169.
- Murray, D. and Beg, A.D. *DNA repair genes and radiosensitivity*. In *DNA Repair in Cancer Therapy 2004*, 211-256, Humana Press, Totawa, NJ
- Nachtrab, U., Oppitz, U., Flentje, M. and Stopper, H. *Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy*. *International Journal of Radiation Biology* 1998;73:279-287.
- Naim, V. and Rosselli, F. *The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities*. *Nature Cell Biology* 2009;11:761-768.
- Nakada, D., Hirano, Y. and Sugimoto, K. *Requirement of the Mre11 complex and exonuclease 1 for activation of the Mec1 signaling pathway*. *Molecular and Cellular Biology* 2004;24:10016-10025.
- Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan, V., New, H.V., Moreau, L.A., Stotsky, M., Mathew, C.G., et al. *Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response*. *Nature Cell Biology* 2002;4:913-920.
- Natarajan, A.T., Meijers, M. and van Rijn, J.L. *Individual variability of human cells in induction of chromosomal alterations by mutagens*. *Progress in Clinical and Biological Research* 1982;109:75-88.
- Natarajan, A.T., Vossen, J. and van Rijn, J.L.S. *Cytogenetic response of Fanconi's anaemia lymphocytes to mitomycin C, X-rays and DNA repair inhibitors*. *Clinical Genetics* 1984;25:210.
- Nijman, S.M., Huang, T.T., Dirac, A.M., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D. and Bernards, R. *The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway*. *Molecular Cell* 2005;17:331-339.
- Nojima, K., Hochegger, H., Saberi, A., Fukushima, T., Kikuchi, K., Yoshimura, M., Orelli, B.J., et al. *Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells*. *Cancer Research* 2005;65:11704-11711.
- O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., et al. *Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents*. *Cancer Research* 1997;57:4285-4300.
- O'Driscoll, M. and Jeggo, P.A. *The role of double-strand break repair - insights from human genetics*. *Nature Reviews: Genetics* 2006;7:45-54.
- Offit, K., Levran, O., Mullaney, B., Mah, K., Nafa, K., Batish, S.D., Diotti, R., et al. *Shared genetic susceptibility to breast cancer, brain tumors, and Fanconi anemia*. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95:1548-1551.
- Okada, H. and Mak, T.W. *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*. *Nature Reviews: Cancer* 2004;4:592-603.

- Olive, P.L. *The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation*. Radiation Research 1998;150:S42-51.
- Otsuka, M., Abe, M., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. and Suzuki, T. *Polymorphism in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene detected by PCR-SSCP analysis*. Pharmacogenetics 1996;6:361-363.
- Pace, P., Mosedale, G., Hodskinson, M.R., Rosado, I.V., Sivasubramaniam, M. and Patel, K.J. *Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway*. Science 2010;329:219-223.
- Pang, Q., Keeble, W., Christianson, T.A., Faulkner, G.R. and Bagby, G.C. *FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity*. EMBO Journal 2001;20:4478-4489.
- Paques, F. and Haber, J.E. *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1999;63:349-404.
- Park, J.H., Park, E.J., Lee, H.S., Kim, S.J., Hur, S.K., Imbalzano, A.N. and Kwon, J. *Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction*. EMBO Journal 2006;25:3986-3997.
- Parshad, R., Sanford, K.K. and Jones, G.M. *Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 1983;80:5612-5616.
- Patel, K.J. and Joenje, H. *Fanconi anemia and DNA replication repair*. DNA Repair (Amst) 2007;6:885-890.
- Paulsen, R.D. and Cimprich, K.A. *The ATR pathway: fine-tuning the fork*. DNA Repair (Amst) 2007;6:953-966.
- Petrović, S., Vujić, D., Guć-Ščekić, M., Leskovac, A., Jevtić, D. and Joksić, G. *Influence of catalase on the radiosensitivity of Fanconi anemia lymphocytes in vitro*. Archives of Biological Sciences 2009;61:195-204.
- Pichierri, P., Averbeck, D. and Rosselli, F. *DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein*. Human Molecular Genetics 2002;11:2531-2546.
- Pichierri, P. and Rosselli, F. *The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways*. EMBO Journal 2004;23:1178-1187.
- Pickart, C.M. and Fushman, D. *Polyubiquitin chains: polymeric protein signals*. Current Opinion in Chemical Biology 2004;8:610-616.
- Pierce, A.J., Hu, P., Han, M., Ellis, N. and Jasin, M. *Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells*. Genes and Development 2001;15:3237-3242.
- Pjanova, D., Engele, L., Randerson-Moor, J.A., Harland, M., Bishop, D.T., Newton Bishop, J.A., Taylor, C., et al. *CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic-based population*. Melanoma Research 2007;17:185-191.
- Pugh, T.J., Keyes, M., Barclay, L., Delaney, A., Krzywinski, M., Thomas, D., Novik, K., et al. *Sequence variant discovery in DNA repair genes from radiosensitive*

- and radiotolerant prostate brachytherapy patients. Clinical Cancer Research* 2009;15:5008-5016.
- Qiu, L.X., Mao, C., Yao, L., Yu, K.D., Zhan, P., Chen, B., Liu, H.G., et al. *XRCC3 5'-UTR and IVS5-14 polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. Breast Cancer Research and Treatment* 2010;122:489-493.
- Raj, A.S. and Heddle, J.A. *The effect of superoxide dismutase, catalase and L-cysteine on spontaneous and on mitomycin C induced chromosomal breakage in Fanconi's anemia and normal fibroblasts as measured by the micronucleus method. Mutation Research* 1980;78:59-66.
- Rajaraman, P., Hutchinson, A., Wichner, S., Black, P.M., Fine, H.A., Loeffler, J.S., Selker, R.G., et al. *DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. Neuro Oncology* 2010;12:37-48.
- Rajeswari, N., Ahuja, Y.R., Malini, U., Chandrashekar, S., Balakrishna, N., Rao, K.V. and Khar, A. *Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. Carcinogenesis* 2000;21:557-561.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., et al. *Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. Nature* 2006;440:105-109.
- Rani, R., Li, J. and Pang, Q. *Differential p53 engagement in response to oxidative and oncogenic stresses in Fanconi anemia mice. Cancer Research* 2008;68:9693-9702.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. *Histone H2A variants H2AX and H2AZ. Current Opinion in Genetics and Development* 2002;12:162-169.
- Reina-San-Martin, B., Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R.F., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C. *H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. Journal of Experimental Medicine* 2003;197:1767-1778.
- Resnick, I.B., Kondratenko, I., Togojev, O., Vasserman, N., Shagina, I., Evgrafov, O., Tverskaya, S., et al. *Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. Journal of Pediatrics* 2002;140:355-361.
- Rey, J.P., Scott, R. and Muller, H. *Apoptosis is not involved in the hypersensitivity of Fanconi anemia cells to mitomycin C. Cancer Genetics and Cytogenetics* 1994;75:67-71.
- Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C., Recio, M.J., Reis, C., et al. *A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. Molecular Cell* 2004;16:715-724.
- Ridet, A., Guillouf, C., Duchaud, E., Cundari, E., Fiore, M., Moustacchi, E. and Rosselli, F. *Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. Cancer Research* 1997;57:1722-1730.
- Roddam, P.L., Rollinson, S., O'Driscoll, M., Jeggo, P.A., Jack, A. and Morgan, G.J. *Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination. Journal of Medical Genetics* 2002;39:900-905.

- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. *Journal of Cell Biology* 1999;146:905-916.
- Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. and Bonner, W.M. *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:9390-9395.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:5858-5868.
- Rooney, S., Chaudhuri, J. and Alt, F.W. *The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development*. *Immunological Reviews* 2004;200:115-131.
- Rosenberg, P.S., Greene, M.H. and Alter, B.P. *Cancer incidence in persons with Fanconi's anemia*. *Blood* 2003;101:822-826.
- Rosselli, F. *Fanconi anaemia syndrome and apoptosis: state of the art*. *Apoptosis* 1998;3:229-236.
- Rosselli, F., Ridet, A., Soussi, T., Duchaud, E., Alapetite, C. and Moustacchi, E. *p53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia*. *Oncogene* 1995;10:9-17.
- Ruppitsch, W., Meisslitzer, C., Hirsch-Kauffmann, M. and Schweiger, M. *Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane*. *FEBS Letters* 1998;422:99-102.
- Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., Parlanti, E., Dogliotti, E., Barnes, D.E., Lindahl, T., et al. *Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases*. *Cancer Research* 2004;64:4411-4414.
- Saber, A., Hochegger, H., Szuts, D., Lan, L., Yasui, A., Sale, J.E., Taniguchi, Y., et al. *RAD18 and poly(ADP-ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair*. *Molecular and Cellular Biology* 2007;27:2562-2571.
- Sakasai, R. and Tibbetts, R.S. *Cell Cycle Regulation and DNA Damage*. In *The DNA damage response: Implication on Cancer Formation and Treatment* 2009, Springer, Dordrecht New York
- Sala-Trepat, M., Rouillard, D., Escarceller, M., Laquerbe, A., Moustacchi, E. and Papadopoulo, D. *Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells*. *Experimental Cell Research* 2000;260:208-215.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S. *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. *Annual Review of Biochemistry* 2004;73:39-85.
- Sasaki, M.S. and Tonomura, A. *A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents*. *Cancer Research* 1973;33:1829-1836.

- Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Redon, C. and Bonner, W.M. *Histone H2AX in DNA damage and repair*. *Cancer Biology & Therapy* 2003;2:233-235.
- Shahidi, M., Mozdarani, H. and Bryant, P.E. *Radiation sensitivity of leukocytes from healthy individuals and breast cancer patients as measured by the alkaline and neutral comet assay*. *Cancer Letters* 2007;257:263-273.
- Shiloh, Y. *Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart*. *Annual Review of Genetics* 1997;31:635-662.
- Shiloh, Y. *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. *Nature Reviews: Cancer* 2003;3:155-168.
- Shimamura, A. and D'Andrea, A.D. *Subtyping of Fanconi anemia patients: implications for clinical management*. *Blood* 2003;102:3459.
- Shimamura, A., Montes de Oca, R., Svenson, J.L., Haining, N., Moreau, L.A., Nathan, D.G. and D'Andrea, A.D. *A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway*. *Blood* 2002;100:4649-4654.
- Shimizu, N., Shimura, T. and Tanaka, T. *Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei*. *Mutation Research* 2000;448:81-90.
- Singh, T.R., Saro, D., Ali, A.M., Zheng, X.F., Du, C.H., Killen, M.W., Sachpatzidis, A., et al. *MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM*. *Molecular Cell* 2010;37:879-886.
- Själänder, A., Birgander, R., Rannug, A., Alexandrie, A.K., Tornling, G. and Beckman, G. *Association between the p21 codon 31 A1 (arg) allele and lung cancer*. *Human Heredity* 1996;46:221-225.
- Smogorzewska, A., Desetty, R., Saito, T.T., Schlabach, M., Lach, F.P., Sowa, M.E., Clark, A.B., et al. *A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair*. *Molecular Cell* 2010;39:36-47.
- Sobeck, A., Stone, S., Costanzo, V., de Graaf, B., Reuter, T., de Winter, J., Wallisch, M., et al. *Fanconi anemia proteins are required to prevent accumulation of replication-associated DNA double-strand breaks*. *Molecular and Cellular Biology* 2006;26:425-437.
- Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L.A., Xia, B., Livingston, D.M., et al. *RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites*. *Science* 2007;316:1198-1202.
- Song, L. *A possible approach for stem cell gene therapy of fanconi anemia*. *Current Gene Therapy* 2009;9:26-32.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M. and Elledge, S.J. *MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint*. *Nature* 2003;421:961-966.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M. and Jeggo, P.A. *ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation*. *Cancer Research* 2004;64:2390-2396.
- Strom, L., Karlsson, C., Lindroos, H.B., Wedahl, S., Katou, Y., Shirahige, K. and Sjogren, C. *Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break*. *Science* 2007;317:242-245.

- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J. and Jackson, S.P. *MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks*. Cell 2005;123:1213-1226.
- Stucki, M. and Jackson, S.P. *gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes*. DNA Repair (Amst) 2006;5:534-543.
- Sullivan, A., Syed, N., Gasco, M., Bergamaschi, D., Trigiant, G., Attard, M., Hiller, L., et al. *Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo*. Oncogene 2004;23:3328-3337.
- Sung, P. and Klein, H. *Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006;7:739-750.
- Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S. and Watanabe, M. *Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation*. Radiation Research 2006;165:269-276.
- Sylvester, R.K., Steen, P., Tate, J.M., Mehta, M., Petrich, R.J., Berg, A. and Kolesar, J. *Temozolomide-induced severe myelosuppression: analysis of clinically associated polymorphisms in two patients*. Anti-Cancer Drugs 2010
- Syljuasen, R.G. *Checkpoint adaptation in human cells*. Oncogene 2007;26:5833-5839.
- Symington, L.S. *Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2002;66:630-670.
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S., Anderson, C.W., et al. *Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription*. EMBO Journal 2002;21:5195-5205.
- Tang, X., Hui, Z.G., Cui, X.L., Garg, R., Kastan, M.B. and Xu, B. *A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage*. Molecular and Cellular Biology 2008;28:2559-2566.
- Taniguchi, T. and D'Andrea, A.D. *Molecular pathogenesis of fanconi anemia*. International Journal of Hematology 2002;75:123-128.
- Taniguchi, T. and D'Andrea, A.D. *Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress*. Blood 2006;107:4223-4233.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., et al. *Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways*. Cell 2002;109:459-472.
- Taniguchi, T., Tischkowitz, M., Ameziane, N., Hodgson, S.V., Mathew, C.G., Joenje, H., Mok, S.C., et al. *Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors*. Nature Medicine 2003;9:568-574.
- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R.S. and Mitra, S. *Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 1990;87:686-690.
- Taylor, A.M.R. *Chromosome instability syndromes*. Best Practice & Research Clinical Haematology 2001;14:631-644.

- Taylor, W.R. and Stark, G.R. *Regulation of the G2/M transition by p53*. *Oncogene* 2001;20:1803-1815.
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L. and Genesca, A. *Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?* *Mutation Research* 2010;705:60-67.
- Tewari, P., Kenny, E., Staines, A., Chanock, S., Browne, P. and Lawler, M. *Genetic variants in XRRC5 may predict development of venous thrombotic events in myeloma patients on thalidomide*. *Blood* 2009;113:5691-5692.
- Teyssier, F., Bay, J.O., Dionet, C. and Verrelle, P. *Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation*. *Bulletin du Cancer* 1999;86:345-357.
- Thompson, L.H. and Hinz, J.M. *Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights*. *Mutation Research* 2009;668:54-72.
- Tischkowitz, M. and Elisabeth, R. *Inherited cancer in children: practical/ethical problems and challenges*. *European Journal of Cancer* 2004;40:2459-2470.
- Tischkowitz, M.D. and Hodgson, S.V. *Fanconi anaemia*. *Journal of Medical Genetics* 2003;40:1-10.
- Tonnies, H., Huber, S., Kuhl, J.S., Gerlach, A., Ebell, W. and Neitzel, H. *Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor*. *Blood* 2003;101:3872-3874.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*. *Cell* 1994;78:67-74.
- Truong, T., Sauter, W., McKay, J.D., Hosgood, H.D., 3rd, Gallagher, C., Amos, C.I., Spitz, M., et al. *International Lung Cancer Consortium: coordinated association study of 10 potential lung cancer susceptibility variants*. *Carcinogenesis* 2010;31:625-633.
- Tseng, R.C., Hsieh, F.J., Shih, C.M., Hsu, H.S., Chen, C.Y. and Wang, Y.C. *Lung cancer susceptibility and prognosis associated with polymorphisms in the nonhomologous end-joining pathway genes: a multiple genotype-phenotype study*. *Cancer* 2009;115:2939-2948.
- Turner, N., Tutt, A. and Ashworth, A. *Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers*. *Nat Rev Cancer* 2004;4:814-819.
- Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E. and Koshland, D. *DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain*. *Molecular Cell* 2004;16:991-1002.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B. and Gasser, S.M. *Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair*. *Cell* 2004;119:777-788.
- van der Heijden, M.S., Brody, J.R., Gallmeier, E., Cunningham, S.C., Dezentje, D.A., Shen, D., Hruban, R.H., et al. *Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells*. *American Journal of Pathology* 2004;165:651-657.

- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*. Nature Reviews: Genetics 2001;2:196-206.
- Vandenberg, C.J., Gergely, F., Ong, C.Y., Pace, P., Mallery, D.L., Hiom, K. and Patel, K.J. *BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2*. Molecular Cell 2003;12:247-254.
- Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., et al. *Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder*. Nature Genetics 2010;42:406-409.
- Venkitaraman, A.R. *Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins*. Nature Reviews: Cancer 2004;4:266-276.
- Veuger, S.J., Curtin, N.J., Smith, G.C. and Durkacz, B.W. *Effects of novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and the DNA-dependent protein kinase on enzyme activities and DNA repair*. Oncogene 2004;23:7322-7329.
- Vinciguerra, P., Godinho, S.A., Parmar, K., Pellman, D. and D'Andrea, A.D. *Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells*. Journal of Clinical Investigation 2010;120:3834-3842.
- Volff, J.-N., ed. *Genome and Disease*. Genome Dynamics Vol. 1. 2006, Karger AG: Basel
- Wagner, J.E., Tolar, J., Levran, O., Scholl, T., Deffenbaugh, A., Satagopan, J., Ben-Porat, L., et al. *Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia*. Blood 2004;103:3226-3229.
- Wang, B. and Elledge, S.J. *Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brcc36 complex in response to DNA damage*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 2007;104:20759-20763.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B. and Elledge, S.J. *53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint*. Science 2002;298:1435-1438.
- Wang, H., Wang, M., Bocker, W. and Iliakis, G. *Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors*. Journal of Cellular Physiology 2005;202:492-502.
- Wang, J.C. *Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2002;3:430-440.
- Wang, S.S., Cozen, W., Severson, R.K., Hartge, P., Cerhan, J.R., Davis, S., Welch, R., et al. *Cyclin D1 splice variant and risk for non-Hodgkin lymphoma*. Human Genetics 2006;120:297-300.
- Wang, W. *Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins*. Nature Reviews: Genetics 2007;8:735-748.
- Wang, W. *A major switch for the Fanconi anemia DNA damage-response pathway*. Nature Structural & Molecular Biology 2008;15:1128-1130.
- Wang, X., Andreassen, P.R. and D'Andrea, A.D. *Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin*. Molecular and Cellular Biology 2004;24:5850-5862.

- Ward, I.M. and Chen, J. *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress*. Journal of Biological Chemistry 2001;276:47759-47762.
- Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G. and Chen, J. *Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX*. Journal of Biological Chemistry 2003;278:19579-19582.
- West, S.C. *Molecular views of recombination proteins and their control*. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:435-445.
- Westphal, C.H. *Cell-cycle signaling: Atm displays its many talents*. Current Biology 1997;7:R789-792.
- Winsey, S.L., Haldar, N.A., Marsh, H.P., Bunce, M., Marshall, S.E., Harris, A.L., Wojnarowska, F., et al. *A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer*. Cancer Research 2000;60:5612-5616.
- Xie, A., Puget, N., Shim, I., Odate, S., Jarzyna, I., Bassing, C.H., Alt, F.W., et al. *Control of sister chromatid recombination by histone H2AX*. Molecular Cell 2004;16:1017-1025.
- Yamamoto, K., Ishiai, M., Matsushita, N., Arakawa, H., Lamerdin, J.E., Buerstedde, J.M., Tanimoto, M., et al. *Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells*. Molecular and Cellular Biology 2003;23:5421-5430.
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T. and Russell, P. *ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1*. Molecular and Cellular Biology 2005;25:5363-5379.
- Zaffaroni, N., Orlandi, L., Villa, R., Bearzatto, A., Rofstad, E.K. and Silvestrini, R. *DNA double-strand break repair and radiation response in human tumour primary cultures*. International Journal of Radiation Biology 1994;66:279-285.
- Zhang, M., Huang, W.Y., Andreotti, G., Gao, Y.T., Rashid, A., Chen, J., Sakoda, L.C., et al. *Variants of DNA repair genes and the risk of biliary tract cancers and stones: a population-based study in China*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 2008;17:2123-2127.
- Zhang, Y., Sturgis, E.M., Zafereo, M.E., Wei, Q. and Li, G. *p14ARF genetic polymorphisms and susceptibility to second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer 2010
- Zhao, S., Weng, Y.C., Yuan, S.S., Lin, Y.T., Hsu, H.C., Lin, S.C., Gerbino, E., et al. *Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products*. Nature 2000;405:473-477.
- Zhu, W. and Dutta, A. *An ATR- and BRCA1-mediated Fanconi anemia pathway is required for activating the G2/M checkpoint and DNA damage repair upon rereplication*. Molecular and Cellular Biology 2006;26:4601-4611.

8. Prilog

8.1. Spisak Slika i Tabela/List of Figures and Tables

8.2. Publikovani radovi iz doktorske disertacije

1. Leskovic, A., Vujić, D., Guć-Šćekić, M., Petrović, S., Joksić, I., Slijepčević, P. and Joksić, G. *Fanconi anemia is characterized by delayed repair kinetics of DNA double-strand breaks*. Tohoku Journal of Experimental Medicine 2010;221:69-76.
2. Petrović, S., Vujić, D., Guć-Šćekić, M., Leskovic, A., Jevtić, D. and Joksić, G. *Influence of catalase on the radiosensitivity of Fanconi anemia lymphocytes in vitro*. Archives of Biological Sciences 2009;61:195-204.

8.1. Spisak Slika i Tabela/ List of Figures and Tables

Slika 1.1. Građa hromatina/ Figure 1.1. Organization of chromatin	3
Slika 1.2. Odgovor na DNK oštećenje/ Figure 1.2. DNA damage response	5
Slika 1.3. Putevi odgovora na dvolančane prekide/ Figure 1.3. Pathways that respond to double-strand breaks	7
Slika 1.4. γ -H2AX-koordinator signaliziranja na mestu dvolančanog prekida DNK/ Figure 1.4. γ -H2AX-coordinator of DNA double-strand breaks signaling	10
Slika 1.5. Putevi popravke dvolančanih prekida DNK/ Figure 1.5. Repair of DNA double-strand breaks... ..	14
Slika 1.6. Regulacija kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa nakon oštećenja DNK/ Figure 1.6. DNA damage-induced cell cycle checkpoint pathways	21
Slika 1.7. FA/BRCA put, uloga FANCD2 proteina/ Figure 1.7. Central role of the FANCD2 protein in the FA/BRCA network	28
Slika 4.1. Učestalost mikronukleusa; bazalna, nakon zračenja i tretmana DEB-om (srednja vrednost \pm S.D.)/ Figure 4.1. Incidence of micronuclei; baseline, after irradiation, and DEB treatment (mean values \pm S.D.)	48
Slika 4.2. Učestalost dvolančanih prekida u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja (srednja vrednost \pm S.D.) .)/ Figure 4.2. Incidence of double-strand breaks before and after irradiation in FA, BMF, and control group (mean values \pm S.D.)	50
Slika 4.3. Fibroblasti obeleženi anti- γ -H2AX antitelom/ Figure 4.3. Fibroblasts immunofluorescently labeled against γ -H2AX	51
Slika 4.4. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja (srednja vrednost \pm S.D.)/ Figure 4.4. Percentage of γ -H2AX foci positive cells before and after irradiation in FA, BMF, and control group (mean values \pm S.D.)	53
Slika 4.5. Distribucija γ -H2AX fokusa pre i nakon zračenja u FA, BMF i kontrolnoj grupi/ Figure 4.5. Distribution of γ -H2AX foci in FA, BMF, and control group before and after irradiation	54
Slika 4.6. Učestalost mikronukleusa u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja (srednja vrednost \pm S.D.)/ Figure 4.6. Incidence of micronuclei in FA, BMF, and control group before, and after irradiation (mean values \pm S.D.)	56
Slika 4.7. Procenat fokus-pozitivnih i fokus-negativnih mikronukleusa u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja/ Figure 4.7. Percentage of γ -H2AX foci positive, and γ -H2AX foci negative micronuclei before and after irradiation in FA, BMF, and control group	57
Slika 4.8. Mononukleusni fibroblasti sa mikronukleusima/ Figure 4.8. Mononuclear fibroblasts with micronuclei	58

Slika 4.9. Učestalost dvolančanih prekida u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om (srednja vrednost \pm S.D.)/ Figure 4.9. Incidence of double-strand breaks before and after DEB treatment in FA, BMF, and control group (mean values \pm S.D.).....	59
Slika 4.10. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om (srednja vrednost \pm S.D.)/ Figure 4.10. Percentage of γ -H2AX foci positive cells before and after DEB treatment in FA, BMF, and control group (mean values \pm S.D.)	61
Slika 4.11. Distribucija γ -H2AX fokusa pre i nakon tretmana DEB-om u FA, BMF i kontrolnoj grupi/ Figure 4.11. Distribution of γ -H2AX foci before and after DEB treatment in FA, BMF, and control group.....	62
Slika 4.12. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja/ Figure 4.12. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after irradiation in FA, BMF, and control group	67
Slika 4.13. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA, BMF i kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om/ Figure 4.13. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after DEB treatment in FA, BMF, and control group	71
Slika 4.14. Flow citometrijski prikaz ćelijskog ciklusa i apoptoze pre i 24 h nakon zračenja i tretmana DEB-om/ Figure 4.14. Cell cycle and apoptosis flow cytometry data before, 24 h after irradiation, and DEB treatment.....	72
Tabela 4.1. Spontane i DEB-indukovane hromozomske aberacije u limfocitima pacijenata sa aplazijom kostne srži/ Table 4.1. Spontaneous and DEB-induced chromosomal aberrations in lymphocyte cultures established from bone marrow failure patients.....	40
Tabela 4.2. Spontane i DEB-indukovane hromozomske aberacije u fibroblastima pacijenata sa aplazijom kostne srži/ Table 4.2. Spontaneous and DEB-induced chromosomal aberrations in fibroblast cell lines established from bone marrow failure patients.....	41
Tabela 4.3. Primarne ćelijske linije; FA-pacijenti sa Fankonijevom anemijom, BMF-pacijenti sa aplazijom kostne srži i kontrolna grupa/ Table 4.3. Primary fibroblast cell lines; FA-Fanconi anemia patients, BMF-bone marrow failure patients, and corresponding controls.....	41
Tabela 4.4. Bazalna učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod FA pacijenata/ Table 4.4. Baseline incidence of micronuclei, and proliferation index in fibroblasts of FA patients.....	42
Tabela 4.5. Bazalna učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod BMF pacijenata/ Table 4.5. Baseline incidence of micronuclei, and proliferation index in fibroblasts of BMF patients.....	43
Tabela 4.6. Bazalna učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnoj grupi/ Table 4.6. Baseline incidence of micronuclei, and proliferation index in control fibroblasts	44
Tabela 4.7. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod FA pacijenata nakon zračenja/ Table 4.7. Incidence of radiation-induced micronuclei, and proliferation index in fibroblasts of FA patients	45
Tabela 4.8. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod BMF pacijenata nakon zračenja/ Table 4.8. Incidence of radiation-induced micronuclei, and proliferation index in fibroblasts of BMF patients	45

Tabela 4.9. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnoj grupi nakon zračenja/ Table 4.9. Incidence of radiation-induced micronuclei, and proliferation index in control fibroblasts.....	46
Tabela 4.10. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod FA pacijenata nakon tretmana DEB-om/ Table 4.10. Incidence of DEB-induced micronuclei, and proliferation index in fibroblasts of FA patients.....	47
Tabela 4.11. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks kod BMF pacijenata nakon tretmana DEB-om/ Table 4.11. Incidence of DEB-induced micronuclei, and proliferation index in fibroblasts of BMF patients.....	47
Tabela 4.12. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnoj grupi nakon tretmana DEB-om/ Table 4.12. Incidence of DEB-induced micronuclei, and proliferation index in control fibroblasts.....	48
Tabela 4.13. Učestalost dvolančanih prekida pre i nakon zračenja/ Table 4.13. Incidence of double-strand breaks before, and after irradiation.....	49
Tabela 4.14. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija pre i nakon zračenja/ Table 4.14. Percentage of γ -H2AX foci positive cells before and after irradiation.....	52
Tabela 4.15. Učestalost mikronukleusa pre i nakon zračenja/ Table 4.15. Incidence of micronuclei before, and after irradiation.....	55
Tabela 4.16. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih i γ -H2AX fokus-negativnih mikronukleusa pre i nakon zračenja/ Table 4.16. Percentage of γ -H2AX foci positive, and γ -H2AX foci negative micronuclei before and after irradiation.....	57
Tabela 4.17. Učestalost dvolančanih prekida (γ -H2AX fokusa) pre i nakon tretmana DEB-om/ Table 4.17. Incidence of double-strand breaks (γ -H2AX foci) before and after DEB treatment.....	59
Tabela 4.18. Procenat γ -H2AX fokus-pozitivnih ćelija pre i nakon tretmana DEB-om/ Table 4.18. Percentage of γ -H2AX foci positive cells before and after DEB treatment.....	60
Tabela 4.19. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA grupi pre i nakon zračenja/ Table 4.19. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after irradiation in FA group.....	64
Tabela 4.20. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u BMF grupi pre i nakon zračenja/ Table 4.20. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after irradiation in BMF group.....	65
Tabela 4.21. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u kontrolnoj grupi pre i nakon zračenja/ Table 4.21. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after irradiation in control group.....	66
Tabela 4.22. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u FA grupi pre i nakon tretmana DEB-om/ Table 4.22. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after DEB treatment in FA group.....	68
Tabela 4.23. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u BMF grupi pre i nakon tretmana DEB-om/ Table 4.23. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after DEB treatment in BMF group.....	69
Tabela 4.24. Ćelijski ciklus i procenat ćelija u apoptozi u kontrolnoj grupi pre i nakon tretmana DEB-om/ Table 4.24. Cell cycle and percentage of apoptotic cells before, and after DEB treatment in control group.....	70

Tabela 4.25. Rezultati analize nukleotidnih izmena gena uključenih u puteve popravka DNK/ ***Table 4.25.***
Analysis of single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes 74

Tabela 4.26. Rezultati analize nukleotidnih izmena gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa/ ***Table 4.26.***
Analysis of single nucleotide polymorphisms in cell cycle control genes..... 75

8.2. *Publikovani radovi iz doktorske disertacije*

Fanconi Anemia Is Characterized by Delayed Repair Kinetics of DNA Double-Strand Breaks

Andreja Leskovic,¹ Dragana Vujic,² Marija Guc-Scekic,² Sandra Petrovic,¹
Ivana Joksic,¹ Predrag Slijepcevic³ and Gordana Joksic¹

¹Vinca Institute of Nuclear Sciences, Belgrade, Serbia

²Mother and Child Health Care Institute of Serbia, Belgrade, Serbia

³Brunel Institute of Cancer Genetics & Pharmacogenomics, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, UK

Among patients with bone marrow failure (BMF) syndrome, some are happened to have underlying Fanconi anemia (FA), a genetically heterogeneous disease, which is characterized by progressive pancytopenia and cancer susceptibility. Due to heterogeneous nature of the disease, a single genetic test, as in vitro response to DNA cross-linking agents, usually is not enough to make correct diagnosis. The aim of this study was to evaluate whether measuring repair kinetics of radiation-induced DNA double-strand breaks (DSBs) can distinguish Fanconi anemia from other BMF patients. An early step in repair of DSBs is phosphorylation of the histone H2AX, generating γ -H2AX histone, which extends over mega base-pair regions of DNA from the break site and is visualised as foci (γ -H2AX foci) with specific antibodies. The primary fibroblasts, established from FA patients, were exposed to γ -rays, a dose of 2 Gy (⁶⁰Co), incubated for up to 24 hours under repair-permissive conditions, and assayed for the level of γ -H2AX foci and apoptosis at different recovery times after the treatment. Cell lines originating from FA patients displayed a significant delay in the repair of radiation-induced DNA DSBs relative to non-FA bone marrow failure (non-FA BMF) and control cell lines. The delay is especially evident at recovery time of 24 hours, and is seen as about 8-fold increase of residual γ -H2AX foci compared to self-state before irradiation. The delay in repair kinetics of FA cells represents the unique feature of FA cellular phenotype, which should be exploited to distinguish FA cellular phenotype.

Keywords: double-strand breaks; repair kinetics; γ -H2AX foci; apoptosis; irradiation

Tohoku J. Exp. Med., 2010, 221 (1), 69-76. © 2010 Tohoku University Medical Press

Fanconi anemia (FA) is a rare recessive disorder characterized by diverse developmental abnormalities, progressive bone marrow failure (BMF) and predisposition to both hematological malignancies and solid tumors (Okuyama and Mishina 1987). The hallmark of the FA cellular phenotype is sensitivity to DNA cross-linking agents such as mitomycin C (Sasaki and Tonomura 1973) and diepoxybutane (DEB) (Auerbach and Wolman 1976; Auerbach et al. 2003). However, results obtained after exposure of FA cells to ionizing radiation are not uniform. For example, cells from patients that belong to complementation groups FANC-A, FANC-C and FANC-F show defects in rejoining DNA double-strand breaks (DSBs), but surprisingly the cellular radiosensitivity is normal (Sasaki and Tonomura 1973; Natarajan et al. 1984; Casado et al. 2005). By contrast, some reports claim that FA cells are radiosensitive, and these claims are supported by observations of clinical radiosensitivity after preconditioning for bone marrow transplantation (Gluckman et al. 1983; Gluckman et al. 1990; Marcou et al. 2001).

Although laboratory analysis of chromosomal aberrations induced by DEB or other crosslinking agents provides a unique diagnostic marker, accurate diagnosis of FA can be difficult. As a result, diagnostic strategies combining different tests, in addition to the above chromosomal aberration test, are needed. A recent study by Pinto and coworkers (Pinto et al. 2009) suggests the flow cytometry-based mitomycin C sensitivity test as a reliable alternative method to evaluate FA phenotype in fibroblasts. Assuming that Fanconi anemia belongs to human disorders that are conferred by defects in proteins that function in response to DNA DSBs, a newly developed method, gamma phosphorylation assay is used to study response and sensitivity to ionizing radiation (Kinner et al. 2008). Phosphorylation of histone H2AX is one of the first steps in DNA DSBs repair. Within minutes of the induction of DNA DSBs, histones H2AX become phosphorylated at serine 139 and form γ -H2AX, which extend over mega base-pair regions and can be readily visualised as foci (γ -H2AX foci) using antibodies specific for phosphorylated H2AX. The γ -H2AX-foci are

Received January 19, 2010; revision accepted for publication March 30, 2010. doi:10.1620/tjem.221.69

Correspondence: Gordana Joksic, Vinca Institute of Nuclear Sciences, Mike Petrovica Alasa 12-14, 11 000 Belgrade, Serbia.

e-mail: gjoksic@vinca.rs

an indication of unrepaired DNA double-strand breaks (Rogakou et al. 1998; Fernandez-Capetillo et al. 2003) γ -H2AX foci are essential for the efficient evaluation of the DNA repair kinetics.

In this study we wanted to find out whether measuring repair kinetics of DNA DSBs using γ -H2AX assay (Kinner et al. 2008) can distinguish FA from other BMF patients, and to investigate possibility of its employment as predictive test of cellular radiosensitivity *in vitro*. We used ionizing radiation and DEB to induce DNA damage and monitored DNA DSBs repair kinetics. Interestingly, our results revealed that cells from FA patients show delayed repair kinetics after exposure to ionizing radiation, but not DEB, suggesting that repair kinetics of ionizing radiation induced DSBs can be used to distinguish FA from non-FA BMF patients and should be considered as a specific characteristic of FA cellular phenotype.

Methods

Subjects

From January 2006 to January 2008, 27 consecutive patients and their parents visited Institute for Mother and Child Care in Belgrade. At least one medical appointment with complete history and physical examination were performed by FA-experienced physician and data recorded. Patients included in study were children with progressive bone marrow failure, without full clinical picture of FA or any evidence of underlying etiology and diagnosis was based on commonly seen findings and subjective impression of the physician. The children (10 boys and 17 girls) were aged 8 ± 6 years on the average. Various hematological parameters including Hb [median (range) 8.6 (2.1-14.9) g/dL], WBC [median (range) $3.0 (0.2-9.2) \times 10^9/L$] and neutrophils [median (range) $0.6 (0.03-5.8) \times 10^9/L$] clearly indicated BMF patients. Only one patient was presented with growth retardation, radial ray aplasia and renal abnormalities. All the others had no major congenital anomalies.

Peripheral bloods from 27 patients and their parents (mainly mothers) were collected. To confirm FA cellular phenotype, baseline incidence of chromosomal aberrations and classic chromosomal breakage DEB test on peripheral blood lymphocytes have been used as first tests (Auerbach et al. 2003) in both, children and their parents. The results of DEB sensitivity showed that 10 patients out of 27 were DEB positive (four boys and six girls) whereas only in one subject in parent group chromosomal aberrations were found. From DEB positive patients fragments of skin were obtained with a minimally invasive 3mm punch using standard technique, and skin fibroblasts were cultured. Harvested fibroblasts were also DEB tested and chromosome aberrations were recorded according to criteria of Auerbach et al. (2003). Control cell lines were obtained from skin biopsies of healthy volunteers undergoing plastic surgery. Methods that are further employed (γ -H2AX and apoptosis assays) were approved by Ethical Committee, and parents signed an informed consent regarding this investigation.

Tissue culture and chromosomal aberrations analysis

For all experiments described here, exclusively cell lines in early passages (passage number 4) were used. The DEB test in fibroblasts confirmed 6 DEB positive patients, who were further considered as FA patients, while 4 were DEB negative and were further

considered as non-FA BMF patients. The complementation group analysis (Universität Würzburg, Institut für Humangenetik, Germany) showed that one of the FA patients belonged to the FANC-D2 complementation group and the remaining five patients belonged to the FANC-A complementation group. Control primary fibroblasts were taken from six healthy volunteers undergoing plastic surgery. Each fibroblast culture grew successfully and a total of 16 primary fibroblast cell lines have been established. All cell lines were grown under standard tissue culture conditions in DMEM (Gibco, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Gibco, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) at 37°C and in the atmosphere of 10% CO₂. For immunostaining, exponentially growing cells were seeded on polylysine glass slides (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany) and allowed to attach to the slide surface for 24 h before treatment with ionizing radiation or DEB.

Irradiation and DEB treatment

Cells were irradiated using ⁶⁰Co γ -ray source (dose of 2.0 Gy at a dose-rate 0.45 Gy/min). The dimensions of the radiation field were 20 x 20 cm and the distance from the source was 74 cm. After irradiation, cells were returned to the tissue culture incubator. The repair kinetics of DNA double-strand breaks were measured before (untreated) and at different times after exposure to ionizing radiation (30 minutes, 2 hours, 5 hours and 24 hours) using γ -H2AX assay (see below).

Duplicate seeded polylysine coated glass-slides were treated with DEB (0.1 μ g/ml) according to method of Auerbach (Auerbach et al. 2003) and examined at the same recovery periods as irradiated cells using γ -H2AX assay.

γ -H2AX assay

At various time points after the treatment, the cells were fixed in a 4% formaldehyde (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), permeabilised with 0.2% triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany) and stained with the H2AX primary antibody (Upstate, Cell Signalling Solutions, Lake Placid, NY, USA) and a FITC-labeled secondary antibody (DAKO Ltd., Cambridgeshire, UK). The slides were mounted with a 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing antifade solution (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), covered with coverslips and sealed. Foci positive for γ -H2AX were counted using an epifluorescent Axiomager A1 microscope (Carl Zeiss, Germany) and the computer software Image J.

Apoptosis and cell cycle analysis

For apoptosis assay, at each time point after irradiation and/or DEB treatment, cells were detached from flasks surface with 0.025M trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen Ltd., Paisley, UK), washed with pre-warmed PBS (Bioatlas, Tartu, Estonia) at 37°C and fixed in 96% ethanol. Apoptosis was assessed by flow cytometric (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) identification of cells displaying apoptosis associated DNA condensation. DNA content was assessed by measuring the UV fluorescence of propidium iodide-stained DNA. Apoptotic population and cell cycle analysis was performed using CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Results

Baseline incidence of chromosome aberration in blood samples from all patients ranged from 0 to 0.27 breakages per cell. The results of DEB sensitivity revealed that only

Table 1. Spontaneous and DEB induced chromosomal aberrations (CAs) in lymphocyte cultures established from 10 BMF patients.

Patients	Spontaneous CAs/cell	Frequencies of DEB induced CAs/cell
1	0.07	0.34
2	0.05	0.45
3	0.23	0.47
4	0.08	0.37
5	0.07	0.34
6	0.18	0.39
7	0.06	0.38
8	0.06	0.35
9	0.08	0.38
10	0.05	0.37

Table 2. Spontaneous and DEB induced chromosomal aberrations (CAs) in patients' fibroblasts; subjects 1-6 were clearly sensitive to DEB relative to the remaining.

Cell line	Spontaneous CAs/cell	Frequencies of DEB induced CAs/cell
1	0.08	0.32
2	0.05	0.49
3	0.18	0.41
4	0.06	0.38
5	0.05	0.36
6	0.11	0.31
7	0.01	0.01
8	0.00	0.00
9	0.00	0.01
10	0.01	0.01

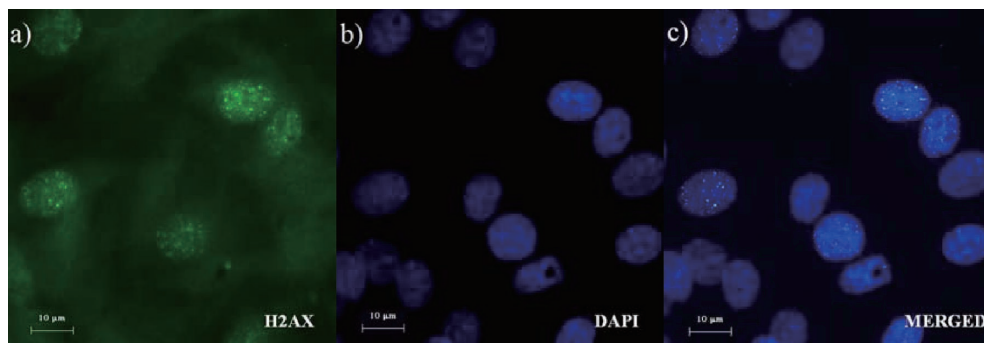


Fig. 1. Fibroblasts established from FA patients (a) immunofluorescently labeled against phospho-H2AX, (b) counterstained blue with DAPI and (c) shown merged.

10 subjects, out of 27, were DEB positive (Table 1). Interestingly, the response to DEB in fibroblasts from those 10 patients revealed 6 subjects with typical FA cellular phenotype, whereas remaining 4 were DEB negative and were further considered as non FA BMF patients (Table 2). It was confirmed that one of the DEB positive cell lines belonged to the FANC-D2 complementation group and the remaining five patients belonged to the FANC-A complementation group.

The analysis of repair kinetics of DNA DSBs after irradiation is shown in Fig. 1. The maximal frequency of radiation-induced γ -H2AX foci was observed in FA cell lines 30 minutes after irradiation and was significantly higher compared to non-FA BMF cell lines ($p < 0.05$). Furthermore, the frequency of γ -H2AX foci 24 hours after irradiation was significantly higher in FA cell lines relative to both non-FA BMF ($p < 0.01$) and control cell lines ($p < 0.001$). The results indicate that FA cell lines display significant delay in repair kinetics 24 hours after irradiation seen as 8-fold increase of unrepaired DNA DSBs (Fig. 2a) compared to self-state before irradiation ($p < 0.01$).

The analysis of apoptotic response and cell cycle progression by flow cytometry (Fig. 3) revealed that both cell types, FA and non-FA BMF, displayed statistically signifi-

cant difference in the apoptotic response compared to control only 30 minutes after irradiation ($p < 0.05$), whereas at all other examined recovery times no significant differences between groups were found (Table 4 and Fig. 2c). The cell cycle analysis has shown difficulties of FA cells in progressing through the cell cycle. In untreated FANCD2 cell line, significant portion of cells has been arrested in G2/M, whereas after irradiation majority of cells are permanently arrested in G2/M. All non-FA cell lines are found to be in the S-phase of the cell cycle in untreated samples, whereas in irradiated samples high number of cells dying via apoptosis follows each decline of S-phase cells. Controls behave in similar manner: most of the irradiated cells are in S-phase of the cell cycle, and this number correlates negatively with numbers of cells dying via apoptosis ($p < 0.05$).

The response of FA cells to DEB treatment is seen as statistically insignificant when analyzing frequencies of γ -H2AX foci (Table 3 and Fig. 2b). Interestingly, the yield of DEB-induced foci in neither FA cells nor non-FA BMF cells is significantly different when compared to the controls. The analysis of apoptosis shows similar patterns (Table 4 and Fig. 2d).

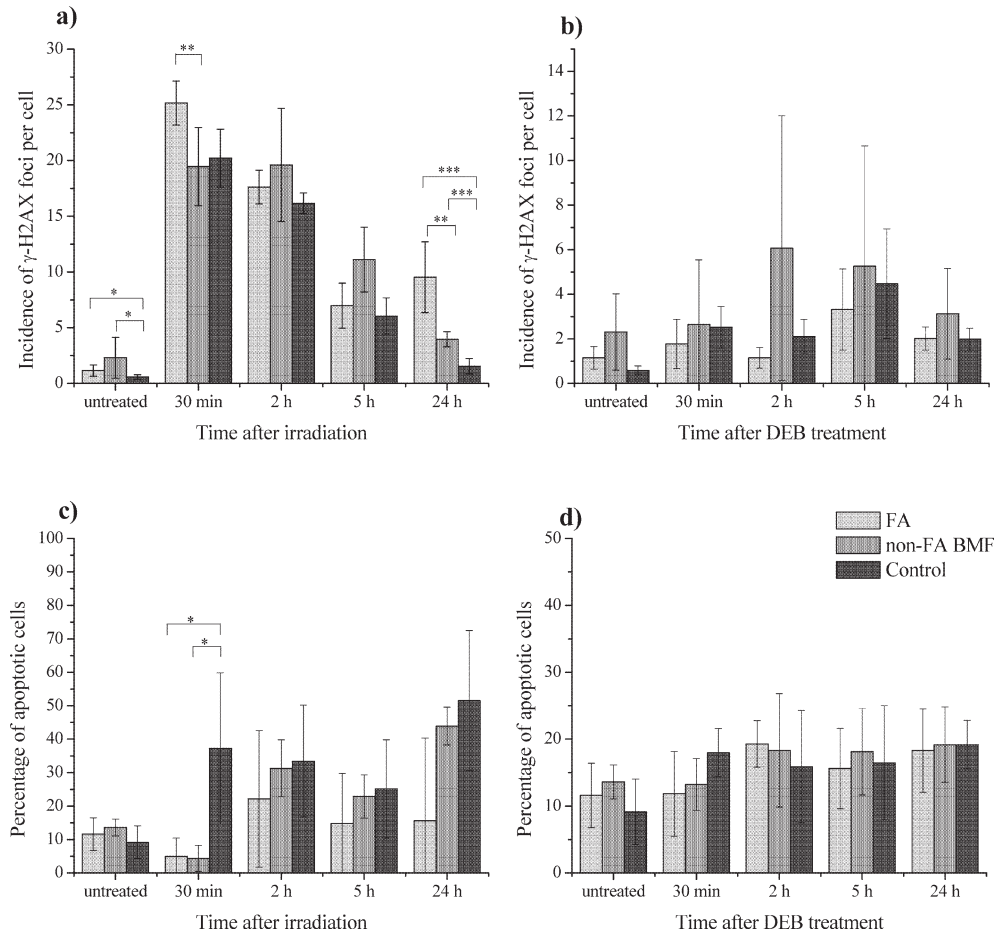


Fig. 2. Frequencies of γ -H2AX positive foci in FA, non-FA BMF and control cell lines (a) after irradiation and (b) DEB treatment. Percentages of apoptotic cells in FA, BMF and control cell lines (c) after irradiation and (d) DEB treatment. Results are presented as mean \pm s.d. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. studied groups by t test.

Discussion

Although FA has been known to clinicians for decades, a correct diagnosis can be difficult due to variations in phenotype severity, or well known problems of cell mosaicism. As a result, recent diagnostic strategies combine different assays (Pinto et al. 2009) to make diagnosis easier. Moreover, patients with BMF underlying Fanconi anemia may experience major toxicity if given standard dose-conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplant. There is also a clinically justified need for quick discrimination between FA and the rest of BMF patients. The classical chromosomal aberration test after DEB exposure is time consuming, requires highly trained personnel and overlap results with other chromosomal instability syndromes. Several earlier studies have reported defects in rejoining DSBs in FA patients (Sasaki and Tonomura 1973; Natarajan et al. 1984; Casado et al. 2005). Since quantification of γ -H2AX foci has emerged as a gold standard for monitoring DSBs levels in human cells (Fernandez-Capetillo et al. 2004), we reasoned that monitoring of DSB repair kinetics could serve as a quick test for identifying FA in a larger

group of BMF patients, enabling at the same time estimation of individual DSB rejoining capabilities, i.e. radiosensitivity.

Quantification of γ H2AX foci allows for an accurate and sensitive detection of DSBs, since phosphorylation rapidly occurs at the site of the DSBs (within 3 min after induction) and specificity of this reaction provides a reliable marker for DSB formation (Rogakou et al. 1998, 2000; Sedelnikova et al. 2002, 2003).

The results obtained in our study have shown that FA patients can be distinguished from the rest of BMF patients, based on γ -H2AX assay, 24 h after exposure of cells to ionizing radiation. Each of our FA patients showed enhanced level of unrepaired DSBs when compared to self-state before irradiation, suggesting that residual γ -H2AX foci, observed 24 hours after irradiation, are reliable measure of DSB rejoining capability. FA cell lines exhibit the highest incidence of radiation-induced foci 30 minutes after irradiation when plateau of foci formation has been reached. However, neither FA nor non-FA cells showed differences in the extent of γ -H2AX formation from those in controls at the time when plateau is reached (30 minutes). When com-

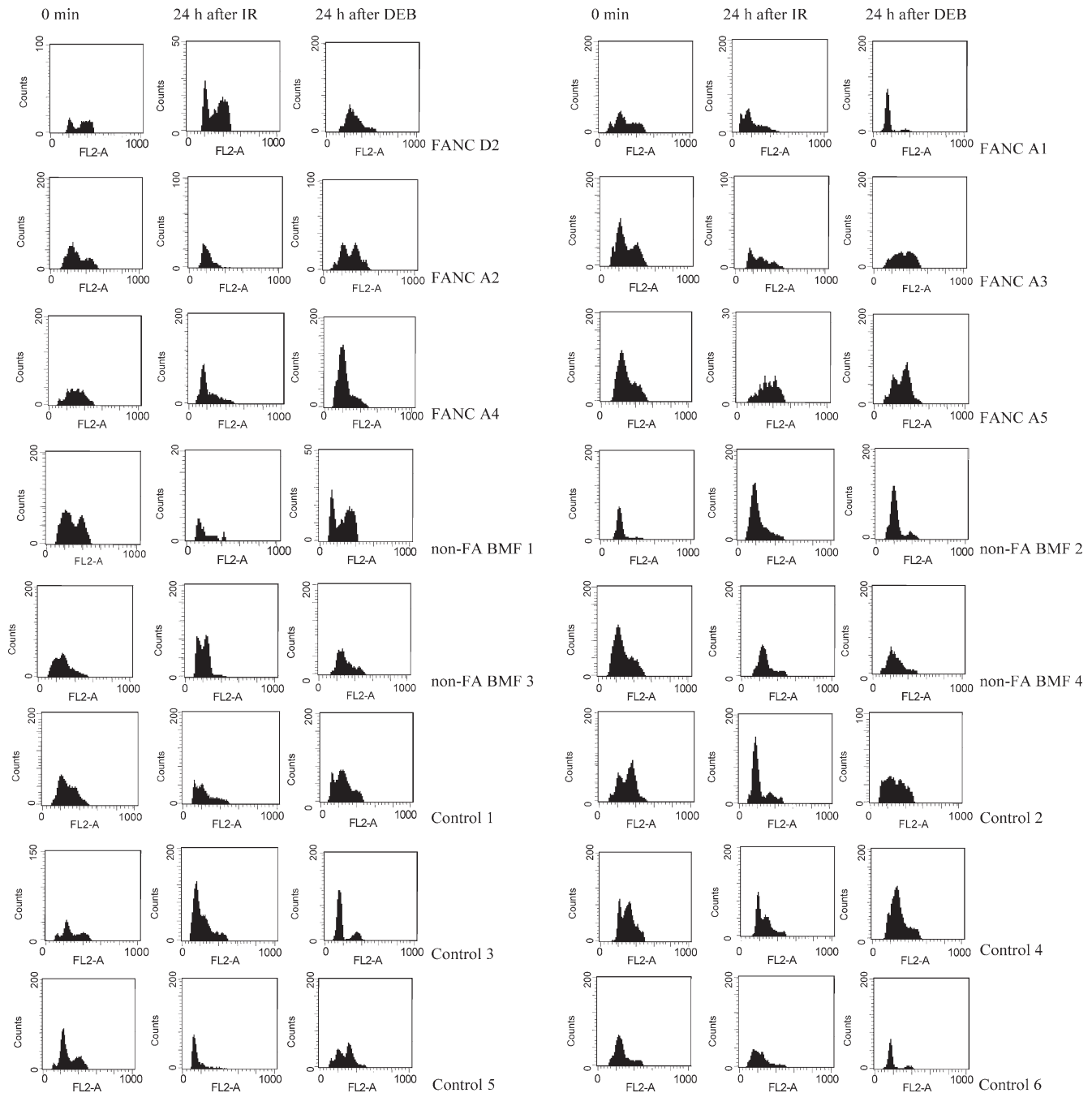


Fig. 3. Apoptosis and cell cycle flow cytometry data before (untreated) and 24 h after irradiation/DEB treatment in FA, non-FA BMF and control cell lines.

pared to the controls both FA and non-FA cell lines show statistically significant difference in frequencies of spontaneous γ -H2AX foci, and particularly 24 hours after irradiation. In FA cell lines frequency of residual γ -H2AX foci is approximately 2.5-fold higher compared to that in non-FA BMF patients and 8-fold higher on the average, when compared to self-state before irradiation. Since it is generally accepted that frequencies of γ -H2AX positive foci at various intervals after treatment with DNA damaging agents reflect kinetics of DSB repair (Rogakou et al. 1999; Redon et al. 2002) it can be concluded that FA cell lines repair

radiation induced DSBs slowly, with a significant delay relative to both non-FA cell lines and control cell lines. Whereas 10.7% of cells in untreated FA cultures before irradiation were focus positive, showing 1.15 ± 0.41 foci per cell, the percentage of focus positive cells 24 hours after irradiation was 45.68, showing 9.53 ± 4.27 foci per cell. It is well known that cell undergoing DNA damage signaling induces cell cycle arrest in order to provide sufficient time for repair. During this time cell either activates or recruits a cascade of proteins needed for a complete repair or commits suicide by apoptosis. Delayed repair kinetics of FA cells

Table 3. Incidence of γ -H2AX foci per cell at different times after irradiation/DEB treatment.

Cell line	untreated	irradiation				DEB			
		30 min	2 h	5 h	24 h	30 min	2 h	5 h	24 h
FANC D2	1.60	24.81	18.37	10.41	13.78	2.97	1.79	5.24	2.84
1	0.80	24.31	19.49	5.04	9.54	0.81	1.21	3.51	1.42
2	1.05	26.36	15.01	5.50	5.25	1.54	0.45	1.21	1.79
FANC A	0.70	25.93	17.3	6.00	12.56	3.34	1.12	5.53	2.42
4	1.94	27.63	17.30	6.63	7.98	1.04	0.87	2.86	1.72
5	0.83	21.93	18.22	8.29	8.05	0.91	1.44	1.56	1.91
mean \pm s.d.	1.15 \pm 0.50	25.16 \pm 1.97	17.62 \pm 1.51	6.98 \pm 2.03	9.53 \pm 3.17	1.77 \pm 1.11	1.15 \pm 0.46	3.32 \pm 1.81	2.02 \pm 0.52
1	1.07	19.04	13.62	11.69	4.12	1.08	6.31	4.79	2.35
non-FA	2.24	15.49	17.80	9.36	3.10	2.36	2.64	3.49	2.72
BMF	4.92	19.28	25.45	14.97	3.90	5.86	12.78	8.33	5.91
4	1.01	24.04	21.57	8.44	4.75	1.31	2.56	4.44	1.55
mean \pm s.d.	2.31 \pm 1.83	19.46 \pm 3.51	19.61 \pm 5.07	11.11 \pm 2.91	3.97 \pm 0.68	2.65 \pm 2.21	6.07 \pm 4.80	5.26 \pm 2.12	3.13 \pm 1.91
1	0.60	20.01	16.50	6.83	1.11	1.50	1.37	1.61	1.49
2	0.40	19.79	14.53	5.23	1.12	2.81	2.33	5.67	1.91
3	0.49	17.89	16.63	7.91	1.90	1.51	1.31	1.57	1.47
Control	0.38	23.84	17.0	3.68	1.23	3.97	1.87	7.72	2.44
5	0.76	22.62	15.54	5.15	1.14	2.59	3.42	4.55	2.68
6	0.86	17.16	16.74	7.53	2.80	2.73	2.31	5.76	1.93
mean \pm s.d.	0.58 \pm 0.20	20.22 \pm 2.60	16.16 \pm 0.94	6.05 \pm 1.63	1.55 \pm 0.68	2.52 \pm 0.93	2.10 \pm 0.78	4.48 \pm 2.46	1.99 \pm 0.49

Table 4. Percentage of apoptotic cells at different times after irradiation/DEB treatment.

Cell line	untreated	irradiation				DEB			
		30 min	2 h	5 h	24 h	30 min	2 h	5 h	24 h
FANC D2	1.60	24.81	2.83	2.20	13.02	4.2	17.38	13.83	18.44
1	0.80	24.31	39.68	26.09	63.13	11.16	17.64	17.99	22.57
2	1.05	26.36	6.90	2.51	81.87	18.74	24.11	14.18	14.63
FANC A	0.70	25.93	54.12	7.52	28.24	4.46	14.57	26.45	12.17
4	1.94	27.63	18.26	39.66	54.84	15.17	22.18	11.82	28.42
5	0.83	21.93	10.90	10.88	43.03	17.22	19.83	9.53	13.56
mean \pm s.d.	1.15 \pm 0.50	25.16 \pm 1.97	22.12 \pm 20.38	14.81 \pm 14.99	47.36 \pm 24.74	11.82 \pm 6.34	19.29 \pm 3.48	15.63 \pm 6.00	18.30 \pm 6.23
1	1.07	19.04	23.20	41.62	78.15	14.51	28.75	21.21	18.61
non-FA	2.24	15.49	31.65	20.35	46.12	9.23	16.45	13.36	27.19
BMF	4.92	19.28	51.89	14.34	41.25	18.05	8.23	25.74	14.24
4	1.01	24.04	18.41	15.24	10.02	11.18	19.87	12.18	16.68
mean \pm s.d.	2.31 \pm 1.83	19.46 \pm 3.51	31.29 \pm 14.79	22.89 \pm 12.77	43.89 \pm 27.89	13.24 \pm 3.88	18.33 \pm 8.49	18.12 \pm 6.47	19.18 \pm 5.63
1	0.60	20.01	28.97	23.14	46.91	13.11	19.70	12.96	17.83
2	0.40	19.79	37.16	30.27	58.02	21.23	6.18	28.97	23.04
3	0.49	17.89	60.11	26.10	55.65	18.71	13.71	9.53	20.26
Control	0.38	23.84	11.89	48.48	24.22	22.18	16.48	17.43	18.83
5	0.76	22.62	40.76	3.83	86.08	14.36	29.88	6.41	22.19
6	0.86	17.16	21.65	19.16	38.17	18.21	9.44	23.38	12.97
mean \pm s.d.	0.58 \pm 0.20	20.22 \pm 2.60	33.42 \pm 16.75	25.16 \pm 14.60	51.51 \pm 20.97	17.97 \pm 3.62	15.90 \pm 8.38	16.45 \pm 8.56	19.19 \pm 3.62

certainly confirms a nature of this disease as DNA repair disease and at the same time gives an opportunity to make diagnosis of FA easier.

Although very similar percentage of focus positive

cells was observed in non-FA cells (12.44% and 46.68%, respectively), even in controls (11.63% and 40.27%, respectively) such delay in repair kinetics is not observed in non-FA cell lines or controls. This unique feature of FA cellular

phenotype can be used for diagnostic purposes for BMF patients with questionable diagnosis, a common clinical situation.

Although several studies showed that DSB arising during cellular processes, such as replication, recombination, and apoptosis, cause an efficient formation of γ -H2AX (Rogakou et al. 2000; Sedelnikova et al. 2002) the delay in DNA repair leads to accumulation of DNA damage and cellular senescence. Our results seem to confirm previous studies reporting delayed repair kinetics of DSB after irradiation in FA cells (O'Driscoll and Jeggo 2006; Thompson and Hinz 2009). The observed delay in repair kinetics of radiation induced DSBs in FA cell lines relative to non-FA cell lines could also be considered as measure of intrinsic radiosensitivity before dose-conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplantation. This test is significantly faster than the analysis of chromosomal aberrations after treatment with cross-linking agents, and it can easily be automated using flow cytometry analysis thus significantly reducing the time between taking cells from patients and availability of results.

In contrast to ionizing radiation, DEB as cross-linking agent poorly induces γ H2AX formation in all examined cell lines. Similar to our findings, no difference in DSBs formation between FA-C and wild type cells was observed by Pichierri, and coworkers (Pichierri et al. 2002), after mitomycin treatment. Moreover, no difference in DEB induced DSBs formation revealed that crosslinking agents induce different signaling for DNA repair than DSBs signaling. The majority of past literature has suggested that FA cellular phenotype can be recognized testing with DNA cross-links agents, which increase spontaneous chromosomal instability. However, recently, Gennery et al. (2004) suggested that other inherited syndromes like ataxia-telangiectasia like disorders, Nijmegen breakage syndrome and other primary immunodeficiency syndromes are positive when testing with crosslinking agents, thus indicating an overlap with the FA cellular phenotype. Similarities in clinical manifestations and cellular phenotypes observed in several syndromes highlight the need for an accurate diagnosis of chromosomal instability syndromes that can no longer be distinguished based on abnormal responses to cross-linking agents. Variants of FA have been described with more pronounced immune deficiency (Taniguchi et al. 2002), and some patients with NBS1 have been described with aplastic anemia, a complication more commonly associated with FA (Resnick et al. 2002). Overlap of clinical manifestations and cellular phenotype address the importance of precise diagnosis of chromosomal instability disorders that can no longer be diagnosed simply from abnormal responses to MMC or DEB. We propose the *in vitro* DSB repair kinetics test after ionizing radiation as a potentially rapid and sensitive test for evaluation of individual FA cellular phenotype.

Acknowledgment

We wish to express our gratitude to Prof. Dr. H. Hoehn and Prof. Dr. D. Schindler (Universität Würzburg, Institut für Humangenetik, Germany) for FA complementation group analysis. This research was supported by Serbian Ministry of Science and Technological Development, Grant No 143046.

References

- Auerbach, A.D. & Wolman, S.R. (1976) Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature*, **261**, 494-496.
- Auerbach, A.D., Greenbaum, J., Pujara, K., Batish, S.D., Bitencourt, M.A., Kokemohr, I., Schneider, H., Lobitz, S., Pasquini, R., Giampietro, P.F., Hanenberg, H. & Levran, O. (2003) Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum. Mutat.*, **21**, 158-168.
- Casado, J.A., Nunez, M.I., Segovia, J.C., Ruiz de Almodovar, J.M. & Bueren, J.A. (2005) Non-homologous end-joining defect in fanconi anemia hematopoietic cells exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res.*, **164**, 635-641.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A. & Nussenzweig, A. (2003) Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle*, **2**, 426-427.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. & Nussenzweig, A. (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 959-967.
- Gennery, A.R., Slatter, M.A., Bhattacharya, A., Barge, D., Haigh, S., O'Driscoll, M., Coleman, R., Abinun, M., Flood, T.J., Cant, A.J. & Jeggo, P.A. (2004) The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. *Clin. Immunol.*, **113**, 214-219.
- Gluckman, E., Devergie, A. & Dutreix, J. (1983) Radiosensitivity in Fanconi anaemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.*, **54**, 431-440.
- Gluckman, E., Devergie, A., Bourdeau-Esperou, H., Thierry, D., Traineau, R., Auerbach, A. & Broxmeyer, H.E. (1990) Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **32**, 423-425.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C. & Iliakis, G. (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5678-5694.
- Marcou, Y., D'Andrea, A., Jeggo, P.A. & Plowman, P.N. (2001) Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother. Oncol.*, **60**, 75-79.
- Natarajan, A.T., Vossen, J.M.J.J. & Van Rijn, J.L.S. (1984) Cytogenetic response of Fanconi's anemia lymphocytes to mitomycin C, X-rays and DNA repair inhibitors. *Clin. Genet.*, **25**, 210.
- O'Driscoll, M. & Jeggo, P.A. (2006) The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 45-54.
- Okuyama, S. & Mishina, H. (1987) Fanconi's anemia as a nature's evolutionary experiment on carcinogenesis. *Tohoku J. Exp. Med.*, **153**, 87-102.
- Pichierri, P., Averbeck, D. & Rosselli, F. (2002) DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2531-2546.
- Pinto, F.O., Leblanc, T., Chamousset, D., Le Roux, G., Brethon, B., Cassinat, B., Larghero, J., de Villartay, J.P., Stoppa-Lyonnet, D., Baruchel, A., Socie, G., Gluckman, E. & Soulier, J. (2009) Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure. *Haematologica*, **94**, 487-495.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K.

- & Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 162-169.
- Resnick, I.B., Kondratenko, I., Togoev, O., Vasserman, N., Shagina, I., Evgrafov, O., Tverskaya, S., Cerosaletti, K.M., Gatti, R.A. & Concannon, P. (2002) Nijmegen breakage syndrome: Clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. *J. Pediatrics*, **140**, 355-361.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.*, **146**, 905-916.
- Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. & Bonner, W.M. (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9390-9395.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5858-5868.
- Sasaki, M.S. & Tonomura, A. (1973) A high susceptibility of fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.*, **33**, 1829-1836.
- Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Redon, C. & Bonner, W.M. (2003) Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol. Ther.*, **2**, 233-235.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G. & Bonner, W.M. (2002) Quantitative detection of (125) IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.*, **158**, 486-492.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., Kastan, M.B. & D'Andrea, A.D. (2002) Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*, **109**, 459-472.
- Thompson, L.H. & Hinz, J.M. (2009) Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights. *Mutat. Res.*, **668**, 54-72.
-

INFLUENCE OF CATALASE ON THE RADIOSENSITIVITY OF FANCONI ANEMIA LYMPHOCYTES *IN VITRO*

SANDRA PETROVIĆ¹, DRAGANA VUJIĆ², MARIJA GUĆ-ŠČEKIĆ², ANDREJA LESKOVAC¹,
DRAGANA JEVTIĆ², and GORDANA JOKSIĆ¹

¹*Vinča Institute of Nuclear Sciences, 11001 Belgrade, Serbia*

²*Dr. Vukan Čupić Mother and Child Health Care Institute, 11070 Belgrade, Serbia*

Abstract — Fanconi anemia (FA) is a genetic disease characterized by progressive pancytopenia and cancer susceptibility. The clinical and cellular phenotypes of Fanconi anemia are associated with a set of redox abnormalities, indicating that FA is an oxidative stress-related disorder. Fanconi anemia cells are highly sensitive to DNA clastogen agents, but their response to ionizing radiation is still unclear. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* radiosensitivity of Fanconi anemia homozygotes and heterozygotes, and to assess the contribution of catalase and superoxide dismutase (SOD) to the overall radiobiological response of the cells. The incidence of radiation-induced lymphocyte micronuclei was used as the indicator of radiation sensitivity *in vitro*, whereas the activity of antioxidant enzymes was determined in erythrocytes. Patients with FA exhibited a two-fold decrease in catalase activity, accompanied by lowered activity of SOD, and increased incidence of baseline micronuclei. In the entire group of patients (with one exception), a reduced yield of radiation-induced micronuclei in lymphocytes was observed, and this was categorized as a radioresistant response. A mild radioresistant *in vitro* response was also observed in carrier-mothers, accompanied by reduced activity of catalase. The radiosensitivity of carrier-fathers was normal. The results of this study suggest that reduced activity of catalase is an important contributor to the radiobiological response of cells.

Key words: Fanconi anemia, catalase, superoxide dismutase, radiosensitivity *in vitro*

UDC 616.006

INTRODUCTION

Fanconi anemia (FA) is a genetically heterogeneous disease characterized by bone marrow failure, congenital abnormalities, and a significant predisposition toward malignancies, particularly acute myeloid leukemia (Okuyama and Mishina, 1987; Alter, 1996). Typically, FA patients develop bone marrow failure leading to aplastic anemia during the first decade of life, and at least 20% of them develop malignancies (Jacquemont and Taniguchi, 2007). The cellular defect responsible for FA is caused by mutation of at least 13 genes and accordingly is subtyped by 13 complementation groups abbreviated from A to N. Fanconi anemia proteins play a central role in coordination of DNA repair, cell cycle, and apoptosis pathways in response to DNA damage. With the exception of FANCD2 and BRCA2, most

of the Fanconi anemia proteins are thought to form large multiprotein complexes, cytoplasmatic and nuclear. Both complexes of FANCA, C, G, E, and F proteins exist *in vivo*. Nuclear complexes are dominant, and patient-derived inactivating mutations of FANCA, FANCC, FANCE, and FANCG proteins reduce assembly, stability, or nuclear translocation of the multi-subunit Fanconi anemia protein complex. The body of evidence in FA research indicates that Fanconi anemia is an oxidative stress-related disease. Patients with FA are defective in repair of oxidative DNA damages, indicating a direct link between reactive oxygen species (ROS) formation, oxidative DNA damage, and chromosomal breakages (Joenje et al., 1981; Dallapiccola et al., 1985; Schindler and Hoehn, 1988; Pagano and Korkina, 2000). One of the main features of Fanconi ane-

mia cells is an elevated incidence of spontaneous chromosomal aberrations, which can be further triggered by clastogenic agents such as mitomycin C (MMC) and diepoxybutane (DEB) (Sasaki and Tonomura, 1973). Nowadays, the DEB-test serves as the most reliable *in vitro* method for verification of the FA cellular phenotype.

Fanconi cells are highly sensitive to DNA cross-linking agents, but their response to ionizing radiation is still unclear. Fanconi anemia cells (complementation groups FA-A, FA-C, and FA-F) show defects in rejoining double-strand breaks, but no difference in the radiosensitivity of normal and FA cells has been reported at the cellular level (Sasaki and Tonomura, 1973; Natarajan et al., 1984; Casado et al., 2005). Fanconi anemia cells also show an increase in the baseline level of micronuclei compared with normal cells, but not in the yield of micronuclei induced by H₂O₂ (Zunino et al., 2001). A number of other reports claim to have shown that FA cells are radiosensitive, and these claims are supported by clinical observations of irradiated FA patients after preconditioning for bone marrow transplantation (Gluckman et al., 1983; Gluckman, 1990). Disparity between clinical and cellular radiosensitivity has also been observed. Marcou et al. (2001) reported a severe clinical radiosensitivity in a single patient who displayed normal radiosensitivity *in vitro* as determined by the colony survival assay.

Our previous investigation of intrinsic radiosensitivity in a healthy population showed marked individual variability in radiation response and the crucial role of cellular antioxidant enzymes in this response (Joksic et al., 1999, 2000; Pajovic et al., 2000). This observation prompted us to investigate the influence of the antioxidative status of FA patients (homozygotes) and carriers (heterozygotes) on cellular radiosensitivity. The study considered a total of nine families and represents the first study of Fanconi anemia families in the Western Balkan region.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

A total of nine families, whose children (six girls and three boys, aged 9 years on average) were clinically

diagnosed with aplastic anemia, were investigated. Five of the subjects displayed typical cellular FA phenotypes (established through the DEB-test), whereas the other four children, who had clinical manifestations of aplastic anemia but normal DEB sensitivity, were classified as non-FA patients. Peripheral blood samples from all individuals were collected by venipuncture in heparinized vacutainers in accordance with current Health and Ethical Regulations in Serbia (2005). The incidence of spontaneously occurring chromosomal aberrations, baseline levels of micronuclei (MN), radiosensitivity, and the activities of catalase and superoxide dismutase were examined.

The incidence of radiation-induced lymphocyte micronuclei was used as the indicator of radiation sensitivity *in vitro*, whereas the activity of antioxidant enzymes was determined in erythrocytes. Four of the five FA patients belong to complementation group A, whereas only one case belongs to the complementation group FANCD1 (BRCA2 mutation was found).

Chromosome aberration analysis

For scoring chromosomal aberrations, standard methods as described in IAEA (2001) were used: aliquots of heparinized whole blood (0.5 mL) were set up in cultures containing PBmax-karyotyping medium (Invitrogen-Gibco, Paisley, UK). Cells were harvested 48 h after initiation of the cultures with addition of colchicine (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) during the last 3 h (final concentration of 2.5 µg/mL). After staining, a hundred well-spread and complete first division metaphases per subject were analyzed for chromosome and chromatid aberrations according to the "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN, 2005).

Irradiation

Two hours after blood collection, an aliquot of heparinized whole blood from each subject was poured into a sterile plastic test-tube positioned in a 15 x 15 cm Plexiglas container and irradiated using a ⁶⁰Co γ-ray source. The radiation dose employed was 2 Gy, the dose-rate was 0.45 Gy/min, dimensions of the radiation field were 20 x 20 cm, and the distance from

the source was 74 cm. Blood samples were irradiated at room temperature.

Micronucleus assay

Baseline levels of micronuclei and radiosensitivity were estimated employing the cytokinesis block micronucleus (CB-MN) method of Fenech et al. (1993). A minimum of 1000 binucleated cells were scored with an AxioImager A1 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a magnification of 400x or 1000x when necessary.

Catalase assay

Catalase activity was measured in hemolyzates using the method of Aebi (1974) by following the catalytic reduction of hydrogen peroxide. Decomposition of the substrate H_2O_2 was measured using a Perkin Elmer Lambda 25 Spectrophotometer (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, USA) at 240 nm. Activity was expressed as K – the rate constant of the first-order reaction per minute per mg protein ($K/\text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \cdot \text{protein}^{-1}$). Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951).

Superoxide dismutase assay

Activity of SOD was measured in hemolyzates using the Oxis Bioxytech® sod-525™ Assay (Oxis International, Inc., Portland, OR, USA). The method is based on the SOD-mediated increase in the rate of autoxidation of reagent 1 (5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo[c]fluorene) in an aqueous alkaline solution, yielding a chromophore with maximum absorbance at 525 nm. One SOD-525 activity unit is defined as the activity that doubles the autoxidation rate of the control blank. The assay was performed using a Perkin Elmer Lambda 25 spectrophotometer (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, USA). The specific enzyme activity of SOD was expressed as units per mg of protein (U/mg of protein). Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951).

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out with the statistical software package Statistica 6.0 for MS Windows using Spearman rank order correlations (R) and

Student's t-test. Values of P at the level of a 95% confidence limit were considered significant.

RESULTS

The incidence of spontaneously occurring chromosomal aberrations, micronuclei, and radiosensitivity for both subgroups (FA and non-FA families) are presented in Table 1; the activities of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase) are presented in Table 2 and Fig. 1.

The analysis of chromosomal aberrations considered chromatid- and chromosome-type breaks, acentric fragments, symmetrical and asymmetrical chromosomes, and chromatid exchanges. Chromatid- and chromosome-type breaks and acentric fragments were considered to be one-break events, while dicentrics, rings and radial figures were counted as two breaks (Auerbach et al., 1989; Wegner and Stumm, 1999).

The incidence of spontaneously occurring chromosomal aberrations in FA patients was almost 4.5-fold higher than that in non-FA individuals.

The baseline level of micronuclei in the entire group of children was 11.69 ± 6.82 (14.24 ± 7.61 in FA children, 8.52 ± 4.77 in non-FA children). The higher incidence of baseline micronuclei in FA patients was accompanied by a 1.75-fold higher percentage of micronucleated BN cells. A positive, statistically significant correlation between baseline levels of micronuclei and incidence of chromosomal aberrations was observed in FA patients ($p < 0.05$).

Fanconi anemia mothers showed a 73% higher baseline level of micronuclei compared to non-FA mothers, whereas no differences in baseline level of micronuclei were observed between FA and non-FA fathers.

Similar results were obtained comparing the percentage of micronucleated cells in FA- and non-FA mothers (1.57-fold increase in FA carriers), whereas no differences between FA- and non-FA fathers were found.

The yield of radiation-induced micronuclei (ra-

Table 1. Incidences of chromosomal aberrations, baseline levels of micronuclei, and radiosensitivity in FA- and non-FA families. Abbreviations: CA - incidence of chromosomal aberrations (breaks per cell); MN - baseline level of micronuclei (MN/1000 BN cells); MNri - incidence of radiation-induced micronuclei (MN/1000 BN cells); % of mBN cells - percentage of micronucleated binucleated cells..

FA families	CA	MN	% of mBN cells	MNri	% of mBN cells
Patient					
1	0.071	21.32	1.84	150.20	14.99
2	0.036	8.50	0.66	71.47	7.54
3	0.230	21.41	2.14	360.51	31.30
4	0.130	15.51	1.55	53.39	6.69
5	0.030	4.45	0.44	96.31	8.90
Mean ± SD	0.099 ± 0.083	14.24 ± 7.61	1.33 ± 0.74	146.38 ± 125.13	13.88 ± 10.26
Mother					
1	0.000	21.49	2.15	118.43	12.14
2	0.000	5.40	0.54	174.29	15.63
3	0.120	41.10	3.20	180.78	18.44
4	0.000	10.18	0.68	136.79	13.48
5	0.000	8.25	0.74	157.65	14.93
Mean ± SD	0.002 ± 0.005	17.28 ± 14.65	1.46 ± 1.17	153.59 ± 25.99	14.92 ± 2.38
Father					
1	0.050	24.04	2.02	146.46	15.23
2	0.010	12.40	1.24	213.45	18.43
3	0.010	14.54	1.35	215.32	19.35
4	0.000	14.86	1.39	111.62	10.41
5	0.000	11.61	0.98	164.03	15.30
Mean ± SD	0.014 ± 0.021	15.49 ± 4.98	1.40 ± 0.38	170.18 ± 44.55	15.74 ± 3.50
Non-FA families					
Patient					
6	0.030	9.77	0.98	58.88	6.59
7	0.020	8.96	0.90	146.23	13.54
8	0.020	1.97	0.20	79.70	7.73
9	0.018	13.39	0.98	86.98	9.12
Mean ± SD	0.022 ± 0.005	8.52 ± 4.77	0.76 ± 0.38	92.95 ± 37.46	9.25 ± 3.04
Mother					
6	0.020	6.33	0.54	120.64	11.65
7	0.000	11.48	1.15	184.06	16.83
8	0.020	9.41	0.94	198.86	17.82
9	0.000	12.75	1.08	202.83	17.62
Mean ± SD	0.010 ± 0.011	9.99 ± 2.80	0.93 ± 0.27	176.60 ± 38.17	15.98 ± 2.92
Father					
6	0.040	31.70	2.50	304.84	25.07
7	0.040	3.92	0.39	140.17	11.83
8	0.000	17.74	1.40	144.97	14.58
9	0.000	14.06	1.31	252.73	22.85
Mean ± SD	0.020 ± 0.023	16.86 ± 11.49	1.40 ± 0.86	210.68 ± 81.49	18.58 ± 6.37

Table 2. Activities of catalase and superoxide dismutase (SOD) in FA- and non-FA families..

FA families	Activity of catalase ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$)	Activity of SOD (U/mg of protein)	Non-FA families	Activity of catalase ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$)	Activity of SOD (U/mg of protein)
Patient			Patient		
1	8.26	31.13	6	18.36	26.37
2	8.51	31.57	7	31.33	36.92
3	11.26	29.67	8	15.02	34.36
4	9.96	31.23	9	21.56	33.46
5	14.42	21.37			
Mean \pm SD	10.48 \pm 2.51	28.99 \pm 4.32	Mean \pm SD	21.57 \pm 7.03	33.45 \pm 5.45
Mother			Mother		
1	8.11	44.00	6	10.40	28.44
2	4.78	25.63	7	27.17	40.81
3	4.57	19.14	8	11.09	38.96
4	12.21	46.25	9	16.23	36.08
5	11.39	26.35			
Mean \pm SD	8.21 \pm 3.58	32.27 \pm 12.09	Mean \pm SD	16.22 \pm 7.75	36.07 \pm 5.44
Father			Father		
1	7.09	34.88	6	11.37	29.60
2	8.56	45.15	7	22.15	52.50
3	8.96	44.60	8	8.39	49.91
4	11.02	40.39	9	13.98	44.01
5	19.40	36.87			
Mean \pm SD	11.00 \pm 4.90	40.38 \pm 4.56	Mean \pm SD	13.97 \pm 5.91	44.00 \pm 10.24

diosensitivity) was 122.63 ± 95.65 in the entire group of patients, 146.38 ± 125.13 in FA-children, and 92.95 ± 37.46 in non-FA children, whereas incidences of radiation-induced micronuclei in FA parents were slightly lower (161.88 ± 35.48) compared to non-FA parents (193.64 ± 61.66). Higher incidence of radiation-induced micronuclei in the FA group was accompanied by a 1.5-fold higher percentage of BN cells carrying micronuclei compared to non-FA.

A statistically significant difference of catalase activity was found in FA children when compared to non-FA children, showing about two-fold decrease ($p < 0.05$). Catalase activity in carrier FA mothers was almost two times lower than that observed in non-FA mothers, whereas FA fathers displayed only slightly reduced activity of catalase when compared to non-FA fathers (Fig. 1).

Activity of SOD in FA children was 13% lower

than that observed in non-FA children, without statistical significance. Lack of statistical significance was also found comparing SOD activity between FA carriers and non-FA parents.

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the contribution of antioxidant enzyme activities to the overall radiobiological response of FA lymphocytes. Radiosensitivity of FA cells, measured by micronuclei formation, significantly differed from that of normal cells. In our previously conducted study ($n = 82$), cluster analysis for yields of radiation-induced micronuclei defined normal sensitivity and radiosensitive and radioresistant cellular responses (Joksic et al., 1999). Corresponding yields of micronuclei were 200 ± 29 , 322 ± 31 , and 136 ± 23 , respectively. In the group of five FA patients, three of them (patients 2, 4, and 5) showed strong radioresistant

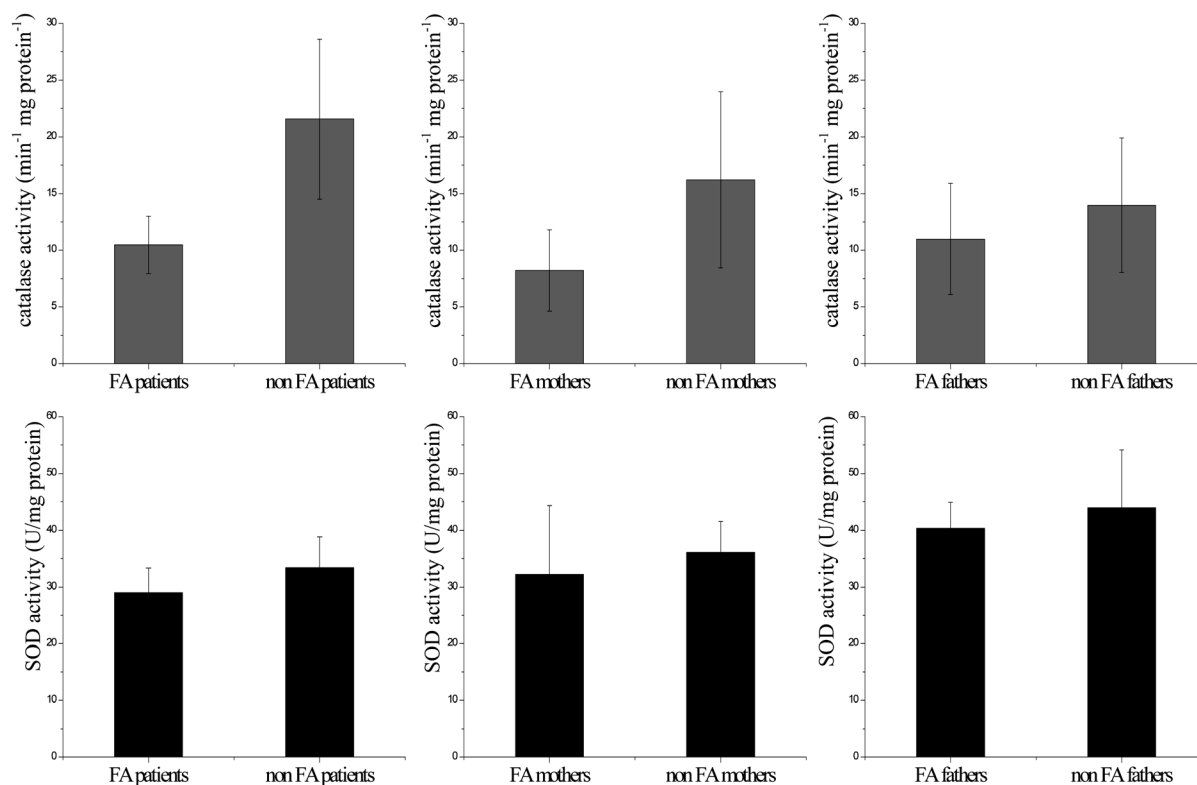


Fig 1. Activities of catalase and superoxide dismutase (SOD) in FA- and non-FA families (means \pm SD)..

responses, one (patient 1-BRCA2) showed a weak radioresistant response, and only one (patient 3) showed a radiosensitive response following *in vitro* irradiation. Fanconi anemia mothers also displayed a weak radioresistant response, while FA fathers showed normal radiosensitivity. In the group of four non-FA patients, three of them (patients 6, 8, and 9) showed strong radioresistant responses and one (patient 7) showed a weak radioresistant response following *in vitro* irradiation. Non-FA mothers as well as non-FA fathers displayed normal sensitivity to ionizing radiation *in vitro*.

A radioresistant response of FA lymphocytes (with one exception) following *in vitro* irradiation and reduced activity of catalase were found in the present study. It is known that catalase is a key enzyme of the cell antioxidative defense, since its catalytic removal of H_2O_2 prevents hydroxyl radical formation. Consequences of catalase defi-

ciency include formation of DNA base adducts such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and increased production of H_2O_2 . It has been reported that large amounts of H_2O_2 induce apoptosis (Zunino et al., 2001; Bai and Cederbaum, 2003; Saadatzadeh et al., 2004). The results of our study showed that FA patients exhibited a two-fold decrease in catalase activity when compared to non-FA patients. Their parents (heterozygous carriers), especially the mothers, also displayed reduced catalase activity, associated with resistant responses to *in vitro* radiation. We hypothesize that the reduced yield of radiation-induced lymphocyte micronuclei *in vitro* was a consequence of catalase deficiency, which in turn leads to overproduction of H_2O_2 and an increased portion of cells undergoing apoptosis. Apoptosis may be secondarily triggered by oxidative stress or DNA damage. Additional production of reactive oxygen species by irradiation generates

intermediates that are capable of inducing apoptosis (Marnett, 2000). It is also important to mention that sex hormones are recognized as modulators of oxidative stress (Tam et al., 2003). Gender- and age-associated differences of oxidative stress parameters in FA patients and carriers have been reported before (Pagano et al., 2004). Thus, it is not surprising that androgen administration has beneficial effects for most FA patients.

Compared to non-FA patients, FA patients displayed a higher incidence of radiation-induced micronuclei, a higher percentage of micronucleated cells, and a two-fold decrease in catalase activity. However, when compared with responses to *in vitro* radiation in healthy members of the population, this response belongs to the radioresistant category. A weakened antioxidative defense system most likely enables overproduction of 8-OHdG and other oxygen radicals, which consequently increase the level of cellular "free" iron ions that catalyze Fenton reactions, enhancing radiotoxicity (Korkina et al., 1992). Decreased catalase activity had been previously reported in FA patients belonging to complementation group A (Takeuchi and Marimoto, 1993). Increased formation of 8-OHdG was also detected in FA patients, as well as in carriers (Degan et al., 1995). It is known that 8-OHdG is the most mutagenic among various oxidative DNA lesions. If left unrepaired, the outcome of this lesion is a G→T transversion, a mutation frequently found in tumor-relevant genes (Loft and Poulsen, 1996). In summary, decreased activity of catalase allows overproduction of oxidative damages in DNA, leading to increased incidence of chromosomal aberrations and micronuclei. Irradiation further damages cells: overdamaged cells might die before entering mitosis, and the surviving fraction of cells might carry multiple injuries.

In FA patient number 3, where a radiosensitive *in vitro* response was observed, further investigations are needed to examine checkpoints. A high percentage of micronucleated binucleate cells as well as increased yield of radiation-induced micronuclei were likely due to checkpoint failure, and cells carrying unrepaired or misrepaired DNA damages then reached mitosis, thus producing micronuclei.

The activity of SOD in FA patients was slightly (13%) reduced compared to non-FA patients and 17% lower than in healthy children (Stojiljkovic et al., 2007). Heterozygotes in the entire group displayed similar values of SOD activity to those in the general population. In regard to the activity of SOD, a key enzyme that detoxifies superoxide anions, the literature provides inconsistent results: significantly reduced in erythrocytes (Joenje et al., 1978, 1979; Mavelli et al., 1982; Yoshimitsu et al., 1984) and normal in FA fibroblasts and white blood cells (Gile et al., 1987; Ruppitsch et al., 1997; Pagano and Korkina, 2000).

In the present study, decreased activity of SOD was accompanied by significantly lowered activity of catalase, indicating a weak antioxidative defense system in FA hematopoietic progenitor cells. It follows that oxidative damages to DNA might overwhelm the cellular repair capacity and lead to enhanced formation of chromosomal aberrations.

The incidence of spontaneous occurrence of chromosomal aberrations in FA patients was 4.5-fold higher than that observed in non-FA patients, and the baseline level of micronuclei in FA patients was 67% higher compared to non-FA and 2.5-fold higher than in healthy children (Neri et al., 2005).

Increased baseline levels of micronuclei in carriers were also found in the current study: FA mothers showed a 73% higher baseline level of micronuclei compared to non-FA and a two-fold increase compared to the healthy population.

A radioresistant response in FA patients (with one exception) following *in vitro* irradiation was demonstrated in the present study. These results are in agreement with other studies in which the authors did not find an increased sensitivity to ionizing radiation in FA patients (Darroudi et al., 1985; Duckworth-Rysiecki and Taylor, 1985; Barquinero et al., 2001). Micronucleus formation is one of the clastogenic effects of radiation. Radioresistant cells, which display a reduced yield of radiation-induced micronuclei, usually lack mitochondrial (mt) DNA and are less likely to undergo apoptosis (Yoshioka et al., 2004). A reduction in mitochondrial gene

expression, known to accompany mtDNA damage, can limit availability of key components of the electron transport chain, which in turn could re-route the flow of electrons and thereby augment mitochondrial oxidant production. It is known that mtDNA in cells plays major roles in ATP production, generation of ROS, and regulation of apoptosis. Owing to this, the mitochondrial genome is considerably more sensitive to oxidative damage than nuclear DNA. Cells lacking mtDNA are more radio-resistant. It can therefore be concluded that serious mitochondrial damages exist in cells of the entire group of our children, which should be examined further. Heterozygous individuals from FA families have not been extensively examined, as they are free of major clinical symptoms. It is therefore worth noting that in our study FA mothers also displayed a weak radioresistant response, while FA fathers showed normal sensitivity following *in vitro* irradiation. The radioresistant response was accompanied by a low percentage of micronucleated binucleated cells (half the normal level) and reduced activity of catalase. To our best knowledge, this is the first report regarding mother-carriers. We hypothesize that mtDNA damages exist in the maternal genotype, are inherited in the offspring, and contribute to progression of the disease. Radiosensitivity testing possibly could serve as a rapid screening test for identification of heterozygotes.

Various FA proteins are reported to be involved in the apoptotic pathway, which could explain the defects in hematopoiesis that are common to all FA patients, regardless of their complementation group (Bogliolo et al., 2002).

Studies of clinical and cellular radiosensitivity of FA cells have reported variable results with no firm conclusions. Micronuclei are clearly an important manifestation of DNA damage. The behavior of cells after irradiation can certainly provide additional information to clinicians and assist in diagnosis of the disease and chemoprevention of its progression. Further investigations are needed to determine the full significance of the radioresistance phenomenon and evaluate whether it is a prognostic factor associated with progression of the disease.

Acknowledgment — This study was supported by the Ministry of Science and Environmental Protection of Serbia (Grant No. 143046).

REFERENCES

- Aebi, H. (1974). Catalase, In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3 (Ed. H. U. Bergmeyer), 673-676. Verlag Chemie, Weinheim.
- Alter, B. P. (1996). Fanconi's anemia and malignancies. *Am. J. Hematol.* **53**, 99-110.
- Auerbach, A. D., Rogatko, A., and T. M. Schroeder-Kurth (1989). International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* **73**, 391-396.
- Bai, J., and A. I. Cederbaum (2003). Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. *J. Biol. Chem.* **278**, 4660-4667.
- Barquinero, J. F., Barrios, L., Ribas, M., Egozcue, J., and M. R. Caballin (2001). Cytogenetic sensitivity of three Fanconi anemia heterozygotes to bleomycin and ionizing radiation. *Cancer Genet. Cytogen.* **124**, 80-83.
- Bogliolo, M., Cabre, O., Callen, E., Castillo, V., Creus, A., Marcos, R., and J. Surrallés (2002). The Fanconi anemia genome stability and tumor suppressor network. *Mutagenesis* **17**, 529-538.
- Casado, J. A., Nunez, M. I., Segovia, J. C., Ruiz de Almodovar, J. M., and J. A. Bueren (2005). Non-homologous end-joining defect in Fanconi anemia hematopoietic cells exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res.* **164**, 635-641.
- Dallapiccola, B., Porfirio, B., Mokini, V., Alimena, G., Isacchi, G., and E. Gandini (1985). Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi's anemia lymphocytes. *Hum. Genet.* **69**, 62-65.
- Darrroudi, F., Vyas, R. C., Vermeulen, S., and A. T. Natarajan (1995). G2 radiosensitivity of cells derived from cancer-prone individuals. *Mutat. Res.* **328**, 83-90.
- Degan, P., Bonassi, S., De Caterina, M., Korkina, L. G., Pinto, L., Scopacasa, F., Zatterale, A., Calzone, R., and G. Pagano (1995). *In vivo* accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anemia families. *Carcinogenesis* **16**, 735-742.
- Duckworth-Rysiecki, G., and A. M. R. Taylor (1985). Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients. *Canc. Res.* **45**, 416-420.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* **285**, 35-44.
- Gille, J., Wortelboer, H., and H. Joenje (1987). Antioxidant status of Fanconi anemia fibroblasts. *Hum. Genet.* **77**, 28-31.

- Gluckman, E. (1990). Radiosensitivity of Fanconi anemia: application to the conditioning for bone marrow transplantation. *Radiother. Oncol.* **18**, 88-93.
- Gluckman, E., Devergie, A., and J. Dutreix (1983). Radiosensitivity in Fanconi anaemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Br. J. Hematol.* **54**, 431-440.
- International Atomic Energy Agency (IAEA) (2001). *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment*. Technical Report Series, No. 405. Vienna.
- ISCN (2005). *An International System for Cytogenetic Nomenclature* (Eds. L. G. Shaffer and N. Tommerup). S. Karger, Basel.
- Jacquemont, C., and T. Taniguchi (2007). The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem.* **8**, S:10. doi: 10.1186/1471-2091-8-S1-S10.
- Joenje, H., Arwert, F., Eriksson, A. W., de Koning, H., and A. B. Oostra (1981). Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature* **290**, 142-143.
- Joenje, H., Eriksson, A. W., Frants, R. R., Arwert, F., and B. Houwen (1978). Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's anemia. *Lancet* **1**, 204.
- Joenje, H., Frants, R. R., Arwert, F., De Bruin, G. J. M., Kostense, P. J., Van de Kamp, J. J. P., De Koning, J., and A. W. Eriksson (1979). Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's anemia established by two independent methods of assay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **39**, 759-764.
- Joksic, G., Pajovic, S. B., Stankovic, M., Pejic, S., Kasapovic, J., Cuttone, G., Calonghi, N., Masotti, L., and D. T. Kanazir (2000). Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation *in vitro*. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 842-850.
- Joksic, G., Petrovic-Novak, A., Stankovic, M., and M. Kovacevic (1999). Radiosensitivity of human lymphocytes *in vitro* correlates more with proliferative ability of cells than with the incidence of radiation-induced damage of the genome. *Neoplasma* **46**, 40-49.
- Korkina, L. G., Samochatova, E. V., Maschan, A. A., Suslova, T. B., Cheremisina, Z. P., and I. B. Afanas'ev (1992). Release of active oxygen radicals by leukocytes of Fanconi anemia patients. *J. Leukoc. Biol.* **52**, 357-362.
- Law on Health Care (2005). Official Gazette of the Republic of Serbia, Parliament of the Republic of Serbia **107**, 112-161.
- Loft, S., and H. E. Poulsen (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* **74**, 297-312.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marcou, Y., D'Andrea, A., Jeggo, P. A., and P. N. Plowman (2001). Normal radiosensitivity in an adult Fanconi anemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother. Oncol.* **60**, 75-79.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-370.
- Mavelli, I., Ciriolo, M. R., and G. Rotilio (1982). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anemia erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 286-290.
- Natarajan, A. T., Vossen, J. M. J. J., and J. L. S. van Rijn (1984). Cytogenetic response of Fanconi's anemia lymphocytes to mitomycin C, X-rays, and DNA repair inhibitors. *Clin. Genet.* **25**, 210.
- Neri, M., Ceppi, M., Knudsen, L. E., Merlo, D. F., Barale, R., Puntoni, R., and S. Bonassi (2005). Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1226-1229.
- Okuyama, S., and H. Mishina (1987). Fanconi's anemia as a nature's evolutionary experiment on carcinogenesis. *Tohoku J. Exp. Med.* **153**, 87-102.
- Pagano, G., Degan, P., D'Ischia, M., Kelly, F. J., Pallard, F. V., Zatterale, A., Anak, S. S., Akisik, E. E., Beneduce, G., Calzone, R., De Nicola, E., Dunster, C., Lloret, A., Manini, P., Nobili, B., Saviano, A., Vuttariello, E., and M. Warnau (2004). Gender- and age-related distinctions for the *in vivo* prooxidant state in Fanconi anemia patients. *Carcinogenesis* **25**, 1899-1909.
- Pagano, G., and L. G. Korkina (2000). Prospects for nutritional interventions in the clinical management of Fanconi anemia. *Cancer Cause Control* **11**, 881-889.
- Pajovic, S. B., Joksic, G., Kasapovic, J., Pejic, S., and D. T. Kanazir (2000). Role of antioxidant enzymes in radiosensitivity of human blood cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**, 325-331.
- Ruppitsch, W., Meisslitzer, C., Weirich-Schwaiger, H., Klocker, H., Scheiderei, H. C., Schweiger, M., and M. Hirsch-Kauffmann (1997). The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. *Hum. Genet.* **99**, 710-719.
- Saadatzadeh, M. R., Bijangi-Vishehsaraei, K., Hong, P., Bergmann, H., and L. S. Haneline (2004). Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 16805-16812.
- Sasaki, M. S., and A. Tonomura (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Res.* **33**, 1829-1836.
- Schindler, D., and H. Hoehn (1988). Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet.* **43**, 429-435.
- Stojiljkovic, V., Todorovic, A., Radlovic, N., Pejic, S., Mladenovic, M., Kasapovic, J., and S. B. Pajovic (2007). Antioxidant enzymes, glutathione, and lipid peroxidation in peripheral blood of children affected by coeliac disease. *Ann. Clin. Biochem.* **44**, 537-543.

- Takeuchi, T., and K. Morimoto (1993). Increased formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, an oxidative DNA damage, in lymphoblasts from Fanconi's anemia patients due to possible catalase deficiency. *Carcinogenesis* **14**, 1115-1120.
- Tam, N. N. C., Gao, Y., Leung, Y.-K., and S.-M. Ho (2003). Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. *Am. J. Pathol.* **163**, 2513-2522.
- Wegner, R. D., and M. Stumm (1999). Diagnosis of chromosomal instability syndromes, In: *Diagnostic Cytogenetics* (Ed. R. D. Wegner), 251-268. Springer-Verlag, Berlin.
- Yoshimitsu, K., Kobayashi, Y., and T. Usui (1984). Decreased superoxide dismutase activity of erythrocytes and leukocytes in Fanconi's anemia. *Acta Hematol.* **27**, 208-210.
- Yoshioka, Y., Yamazaki, H., Ken, Y., Ozeki, S., Inoue, T., Yoneda, M., and T. Inoue (2004). Impact of mitochondrial DNA on radiation sensitivity of transformed human fibroblast cells: clonogenic survival, micronucleus formation, and cellular ATP level. *Radiat. Res.* **162**, 143-147.
- Zunino, A., Degan, P., Vigo, T., and A. Abbondandolo (2001). Hydrogen peroxide effects on DNA, chromosomes, cell cycle, and apoptosis induction in Fanconi anemia cell lines. *Mutagenesis* **16**, 283-288.

УТИЦАЈ КАТАЛАЗА НА РАДИООСЕТЉИВОСТ ЛИМФОЦИТА *IN VITRO* КОД ПАЦИЈЕНАТА ОБОЛЕЛИХ ОД ФАНКОНИЈЕВЕ АНЕМИЈЕ

САНДРА ПЕТРОВИЋ¹, ДРАГАНА ВУЈИЋ², МАРИЈА ГУЂ-ШЋЕКИЋ², АНДРЕЈА ЛЕСКОВАЦ¹,
ДРАГАНА ЈЕВТИЋ², и ГОРДАНА ЈОКСИЋ¹

¹Институт за нуклеарне науке „Винча“, 11001, Београд, Србија

²Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије”Др Вукан Чупић”, 11070 Београд, Србија

Фанконијева анемија (ФА) је генетичко обољење карактерисано прогресивном панцитопенијом и предиспозицијом ка малигнитетима. Асоцирано је са низом абнормалности у редокс процесима у ћелији што га чини и болешћу оксидативног стреса. ФА ћелије су хиперосетљиве на ДНК кластогене агенсе, док су подаци о њиховој осетљивости на јонизујуће зрачење контрадикторни. Циљ ове студије је испитивање *in vitro* радиоосетљивости ФА хомозигота и хетерозигота и утврђивање утицаја активности каталазе и супероксид дисмутазе (СОД) на укупан радиобиолошки одговор ћелија.

ФА пацијенти испољавају двоструко снижење активности каталаза, снижену активност СОД и повећани базални ниво микронуклеуса. Радиорезистентан одговор на јонизујуће зрачење (са једним изузетком) утврђен је у целој групи пацијената. Благи радиорезистентни *in vitro* одговор на јонизујуће зрачење као и снижена вредност каталаза утврђен је и код носиоца-мајки. Носиоци-очеви су испољили нормалну радиоосетљивост. Резултати ове студије показују да снижена вредност каталаза значајно доприноси укупном радиобиолошком одговору ћелија.