



Telomere-gallar á litningum í Fanconi anemia D1

Birna Þorvaldsdóttir



**Líf- og umhverfisvísindadeild
Háskóli Íslands
2013**

Telomere-gallar á litningum í Fanconi anemia D1

Birna Þorvaldsdóttir

12 eininga ritgerð sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum gráðu í líffræði

Leiðbeinendur
Sigríður Klara Böðvarsdóttir
Jórunn Erla Eyfjörð

Umsjónarkennari
Arnar Pálsson

Líf- og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, maí 2013

Telomere-gallar á litningum í Fanconi anemia D1
12 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í líffræði

Höfundarréttur © 2013 Birna Þorvaldsdóttir
Öll réttindi áskilin

Líf- og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Askja, Sturlugötu 7
101 Reykjavík

Sími: 525 4000

Skráningarupplýsingar:
Birna Þorvaldsdóttir, 2013, *Telomere-gallar á litningum í Fanconi anemia D1*, BS ritgerð,
Líf- og umhverfisvísindadeild, Háskóli Íslands, 32 bls.

Prentun: Háskólaprent
Reykjavík, maí 2013

Útdráttur

Fanconi anemia (FA) er víkjandi erfðasjúkdómur sem orsakast af stökkbreytingum í báðum samsætum einhverra *FANC* genanna 15. Genin eru öll hluti af *Fanconi Anemia* ferlinu sem tekur þátt í viðgerðum á DNA, einkum á krosstengslum. FA frumur eru ofurviðkvæmar fyrir krosstengjandi efnum og sýna mikinn litningaóstöðugleika. FA-D1 undirgerðin orsakast af stökkbreytingum í báðum samsætum *BRCA2* gensins og hefur alvarlegustu svipgerðina af undirgerðunum 15. Helstu klínísku svipgerðareinkenni eru ýmsir fæðingargallar, café-au-leit flekkir og föst æxli sem koma fram snemma á lífsleiðinni. *BRCA2* tekur þátt í endurröðunarviðgerðum á tvíþátta DNA brotum og er litningaóstöðugleiki einkenni frumna og krabbameina sem hafa stökkbreytingar í *BRCA2*. Nýlega hefur áður óþekkt hlutverk *BRCA2* við verndun telomera verið uppgötvað en verndun þeirra er nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika í erfðamenginu. Í þessari rannsókn voru telomere-og litningabrenslanir í tveimur FA-D1 frumulínum, Nord og Span skoðaðar með FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) aðferðinni. Þessar gerðir brenglana voru áberandi í báðum FA-D1 frumulínum en á ólíkan hátt. Gallar sem sáust voru tap á telomere-merkjum, litningaendar með mörgum telomere-merkjum, telomere-raðir innan litninga, telomere-raðir utan litninga, litningabrot með og án telomere-merkja og fjölþráðhafta litningar. Þrátt fyrir ólíka tíðni mismunandi galla í FA-D1 frumulínum tveimur staðfesta niðurstöður rannsóknarinnar að *BRCA2* gegnir mikilvægu hlutverki í viðhaldi á stöðugleika erfðamengisins, bæði í viðgerðum á tvíþátta DNA brotum og við verndun og viðhald telomera.

Abstract

Fanconi anemia (FA) is a recessive genetic disorder caused by biallelic mutations in one of the 15 *FANC* genes known to date. These genes are all involved in the *Fanconi Anemia Pathway* which participates in DNA repair, specifically in repairing interstrand DNA cross-links. FA cells are hypersensitive to cross-linking agents and show severe chromosomal instability. The FA-D1 subtype is caused by biallelic mutations in the *BRCA2* gene and conveys the most severe phenotype of the 15 FA subtypes. The main clinical phenotypic traits include birth defects, café-au-leit spots and a high incidence of solid tumors in early childhood. *BRCA2* participates in homologous recombination (HR) repair of DNA double strand breaks and chromosomal instability is a hallmark of *BRCA2* mutated cells and tumors. Recently, a new role for *BRCA2* has been demonstrated regarding telomere protection. Telomere integrity is essential for maintaining genome stability. In this study telomere- and chromosomal abnormalities were observed in two FA-D1 cell lines, Nord and Span, using the fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) method. Both cell lines featured abundant telomere- and chromosome abnormalities but the frequency of specific abnormalities differed between cell lines. Observed abnormalities included telomere-signal loss, multiple telomeric signals, interstitial telomeric sequences, extrachromosomal telomeric repeats, chromosome breaks with and without telomere signals and multicentromeric chromosomes. Regardless of differences in the frequency of the observed abnormalities in the two FA-D1 cell lines, the results confirm that *BRCA2* has an important role in maintaining genome stability, both in repairing DNA double strand breaks and in telomere maintenance and protection.

Efnisyfirlit

Myndir.....	vi
Töflur.....	vii
Skammstafanir	viii
Þakkir	ix
1 Inngangur.....	1
1.1 Fanconi Anemia	1
1.1.1 Klínísk einkenni FA.....	1
1.1.2 Fanconi Anemia ferlið	3
1.1.3 Sérstök einkenni FA frumna og greiningarpróf.....	4
1.2 BRCA2 (FANCD1).....	5
1.2.1 BRCA2 próteinið og hlutverk þess.....	5
1.2.2 Gallar í BRCA2 og tengsl við litningaóstöðugleika	7
1.2.3 Tenging FA og BRCA ferlanna.....	8
1.3 Telomerar	8
1.3.1 Bygging og hlutverk telomera	8
1.3.2 Eftirmyndunarvandamál litningaenda og telomerasi.....	10
1.3.3 Telomere-gallar, öldrun og krabbamein	11
1.3.4 Hlutverk BRCA2 við telomera	11
1.4 Undanfari og markmið verkefnis	12
2 Efni og aðferðir	13
2.1 Frumulínur	13
2.2 Frumurækt.....	13
2.3 Litningaheimtur.....	13
2.4 FISH.....	14
2.5 Myndataka, meðhöndlun mynda og aflestur.....	14
2.6 Tölfræðileg úrvinnsla og meðhöndlun gagna	15
3 Niðurstöður	16
3.1 FA-D1 frumur sýna mikla telomere-galla.....	16
3.1.1 Tap á telomere-merkjum (STL og TFE) í FA-D1 frumum	16
3.1.2 MTS og DMTS voru algengari í Nord en í Span	17
3.1.3 ITS voru algeng í FA-D1 frumum.....	18
3.1.4 ECTR voru til staðar í stórum hluta FA-D1 frumna.....	19
3.2 FA-D1 frumur sýna skýr merki litninga-óstöðugleika.....	20
3.2.1 Litningabrot í FA-D1 frumum.....	20
3.2.2 Fjölpípráðhafta litningar í FA-D1 frumum.....	21
4 Umræður	23
4.1 FA-D1 frumur sýna miklar litninga-og telomera brenglanir	23
4.2 Umræða um FA-D1 frumulínur	25
4.3 Mikill breytileiki var á metafösum innan hvorrar FA-D1 frumulínu.....	25
4.4 Hugleiðingar og hugsanlegt áframhald	26
Heimildir	28

Myndir

Mynd 1-1 <i>Fanconi anemia/BRCA ferlið</i>	3
Mynd 1-2 <i>Dæmi um litningabrensl í FA frumum eftir meðhöndlun með mitomycin C</i>	4
Mynd 1-3 <i>Bygging BRCA2</i>	6
Mynd 1-4 <i>Bygging telomera</i>	9
Mynd 1-5 <i>Shelterin próteinklasinn</i>	9
Mynd 3-1 <i>Dæmi um STL og TFE í FA-D1 frumum</i>	16
Mynd 3-2 <i>STL og TFE í FA-D1 metafösum</i>	17
Mynd 3-3 <i>Dæmi um MTS og DMTS í FA-D1 frumum</i>	17
Mynd 3-4 <i>MTS og DMTS í FA-D1 frumum</i>	18
Mynd 3-5 <i>ITS í FA-D1 frumum</i>	19
Mynd 3-6 <i>ECTR í FA-D1 frumum</i>	20
Mynd 3-7 <i>Litningabrot í FA-D1 frumum</i>	21
Mynd 3-8 <i>Fjölþráðhafta litningar í FA-D1 frumum</i>	22

Töflur

Tafla 1-1 <i>Listi yfir undirgerðir FA</i>	2
Tafla 2-1 <i>Atriði sem skoðuð voru við aflestur mynda</i>	14

Skammstafanir

ALT	Alternative lengthening of telomeres
<i>BRCA1 / BRCA2</i>	Breast Cancer Susceptibility Gene 1/2
BRCA1 / BRCA2	Breast Cancer Susceptibility Protein 1/2
CO-FISH	Chromosome Orientated Fluorescence <i>in situ</i> Hybridisation
DMTS	Double Multiple Telomere Signals
DNA	Deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr veira
ECTR	Extrachromosomal Telomeric Repeats
FANCD1 / FA-D1	Fanconi anemia, complementation group D1
FBS	Fetal Bovine Serum
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridisation
HR	Homologous Recombination
ITS	Interstitial Telomeric Signal
NHEJ	Non Homologous End-joining
NLS	Nuclear localization signal
MTS	Multiple Telomeric Signals
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
RPA	Replication Protein A
STL	Single Telomere Loss
T-SCE	Telomere sister chromatid exchange
TERC	Telomerase RNA component
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TFE	Telomere Free End

Þakkir

Ég vil þakka leiðbeinendum mínum, Sigríði Klöru Böðvarsdóttur og Jórinni Erlu Eyfjörð, fyrir að gera mér kleift að vinna að verkefninu og fyrir mikinn sýndan áhuga, hjálpsemi og leiðsögn. Þakkir eiga einnig skilið Jenný Björk Þorsteinsdóttir fyrir aðstoð og góð ráð við frumuræktun, Margrét Steinarsdóttir, fyrrverandi forstöðumaður erfða- og sameinda-læknisfræðideildar Landsspítala Íslands, og starfsfólk litningarannóknardeildar fyrir að leyfa mér að nota aðsöðuna og veitta aðstoð í þeim efnum. Sérstaklega vil ég þakka Herði Bjarnasyni fyrir að taka sér tíma til að leiðbeina mér við frumuræktun og litningaheimtun ásamt því að vera ávallt tilbúinn til að veita góð ráð. Að lokum vil ég þakka öðru starfsfólki og nemum á Rannsóknarstofu í krabbameinsfræðum við læknadeild Háskóla Íslands fyrir góðar stundir.

1 Inngangur

Arfgengir sjúkdómar eru þeir sjúkdómar sem orsakast af göllum í erfðamenginu og erfast á milli kynslóða. Stökkbreytingar í erfðamenginu geta haft áhrif á myndun eða virkni hinna ýmsu próteina sem starfa í frumum líkamans. Alvarleiki stökkbreytinganna hvað svipgerð varðar fer eftir því hvaða prótein þær hafa áhrif á og í hversu miklum mæli. Afleiðingarnar eru margvíslegar, allt frá því að aukin hætta sé á að fá ákveðinn sjúkdóm til mjög alvarlegra sjúkdóma og fæðingargalla.

Erfðagallar geta verið stökkbreytingar í stökum genum, eða stjórnsvæðum þeirra, sem valda því að próteinafurð er gölluð eða ekki til staðar. Litningagallar er samheiti yfir galla á stærri skala þar sem heilir litningar eða hlutar þeirra hafa margfaldast, tapast eða endurraðast. Að lokum geta sjúkdómar verið af völdum stökkbreytinga í mörgum genum og oft í samspili við umhverfið. Erfðasjúkdómar, líkt og aðrir arfbundnir eiginleikar, geta erfst með ríkjandi, víkjandi eða X-tengdum erfðum en auk þess getur verið um flóknari ferli að ræða, þá sérstaklega þegar samspil er á milli gena eða sýnd er mismikil. Alvarlegir erfðasjúkdómar eru fremur fátíðir og erfast flestir með víkjandi erfðum. Einn slíkur erfðasjúkdómur er Fanconi Anemia.

1.1 Fanconi Anemia

Fanconi Anemia (FA) orsakast af stökkbreytingum í hópi *FANC* genanna sem eru 15 talsins; *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1(BRCA2)*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN*, *FANCO* og *FANCP*. Próteinafurðir *FANC* genanna taka m.a. þátt í viðgerðarferlum á krosstengslum í DNA í svo kölluðu *Fanconi Anemia ferli*. Stökkbreytingar í þessum genum valda margbreytilegum og misalvarlegum svipgerðareinkennum sem eru þrátt fyrir það flokkuð undir sama hatt sem Fanconi Anemia. FA er svo skipt í undirgerðir (FA-A, FA-B o.s.frv.) eftir því hvaða gen er stökkbreytt. Sjúkdómurinn erfist á víkjandi hátt nema í tilfalli *FANCB* sem er á X-litningi og erfist því með X-tengdum erfðum (tekið saman í Alter & Kupfer, 2013).

1.1.1 Klínísk einkenni FA

Fanconi Anemia hlaut nafn sitt frá svissneska barnalækninum Guido Fanconi sem fyrstur lýsti einkennum heilkennisins árið 1923 (Fanconi, 1927). Klínísk einkenni eru mjög fjölbreytt og skiptast í þroskunargalla sem geta verið til staðar við fæðingu og aðra kvilla sem koma fram síðar á lífsleiðinni og draga sjúklinga oft til dauða. Meðal þroskunargalla sem sjást hjá einstaklingum með FA eru afbrigðileg beinabygging (lávaxnir einstaklingar), dverghöfuð (e. microcephaly), afbrigðilegir þumalfingur, gallar í meltingarvegi, óeðlileg litarefnismyndun (café-au-leit flekkir og skortur á litarefni), ýmsir efnaskiptagallar og heyrnarleysi (tekið saman í Shimamura & Alter, 2010). Þroskunargallar finnast ekki hjá öllum FA sjúklingum en 25-40% fæðast án þeirra (Soulier, 2011). Algengustu kvillar sem koma fram síðar á lífsleiðinni eru blóðleysi og beinþurrð en einnig er aukin áhætta á ýmsum krabbameinum. Algengust eru krabbamein í blóði og beinmarg, einkum AML (acute myelogenous leukemia). Önnur algeng æxli eru þekjufrumukrabbamein (e. squamous cell carcinomas) í hálsi og höfði, lifraræxli og heilaæxli (tekið saman í Shimamura & Alter, 2010).

Nýgengi FA er um það bil 3 af hverjum milljón fæðingum og arfberar eru áætlaðir vera 1 af hverjum 300 í Evrópu og Bandaríkjunum. Ákveðnir þjóðernishópar hafa þó hærri tíðni á FA en aðrir vegna landnemastökkbreytinga og má þar helst nefna Ashkenazi gyðinga, þar sem arfberar eru 1 af hverjum 89, og Afrikaners, þar sem arfberar eru 1 af hverjum 83 (tekið saman í Tischkowitz & Hodgson, 2003).

Eins og áður sagði orsakast FA af stökkbreytingum á báðum samsætum í einhverju af *FANC* genunum 15. Í töflu 1-1 má sjá upptalningu á *FANC* genunum, staðsetningu þeirra í erfðamenginu og hlutfalli hvernar undirgerðar af heildar FA-tilfellum. FA-A er langalgengasta undirgerðin, um 66% FA tilfella, FA-C og FA-G telja svo um 10% tilfella hvor en aðrar undirgerðir eru sjaldgæfari. Fylgni milli svipgerða og arfgerða er ekki mikil. Svipgerðir eru gríðarlega misjafnar jafnt innan sem og milli undirgerða þar sem ólíkar stökkbreytingar geta haft mismunandi áhrif. FA-A virðist þó almennt hafa væg svipgerðareinkenni en FA-C, FA-D1 og FA-E alvarlegri (Kee & D'Andrea, 2012).

Tafla 1-1 Listi yfir undirgerðir FA. Heiti FA gena (önnur samheiti í sviga), staðsetning í erfðamenginu og hlutfallsleg tíðni hvernar undirgerðar af heildar FA tilfellum. þekkt

Gen (samheiti)	Lókus	Stökkbreytitiðni
<i>FANCA</i>	16q24.3	~66%
<i>FANCB</i>	Xp22.31	~2%
<i>FANCC</i>	9q22.3	~10%
<i>FANCD1 (BRCA2)</i>	13q12.3	~2%
<i>FANCD2</i>	3p25.3	~3%
<i>FANCE</i>	6p21.3	~2%
<i>FANCF</i>	11p15	~2%
<i>FANCG (XRCC9)</i>	9p13	~10%
<i>FANCI</i>	15q25-26	<2%
<i>FANCI (BACH1, BRIP1)</i>	17q22.3	<2%
<i>FANCL (PHF9)</i>	2p16.1	Sjaldgæft
<i>FANCM</i>	14q21.3	Sjaldgæft
<i>FANCN (PALB2)</i>	16p12.1	Sjaldgæft
<i>FANCO (RAD51C)</i>	17q22	Sjaldgæft
<i>FANCP (SLX4)</i>	16p13.3	Sjaldgæft

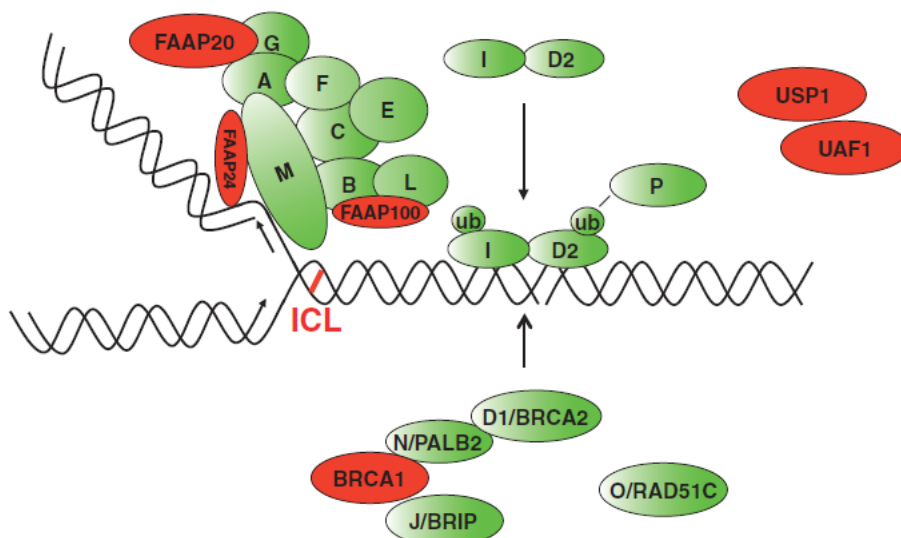
(Breytt og þýtt úr Kee & D'Andrea, 2012)

Í þessu verkefni voru skoðaðar frumur úr einstaklingum með FA-D1. Í því tilviki eru báðar samsætur *FANCD1* gensins stökkbreyttar. *FANCD1* er betur þekkt sem *BRCA2*. Mýs með skaðlegar stökkbreytingar í báðum samsætum *Brca2* eru ekki lífvænlegar (Sharan et al., 1997) og því þarf ekki að koma á óvart að svipgerðin í manni sé alvarleg. Um 2% tilfella FA eru af undirgerðinni FA-D1 og er hún almennt talin hafa alvarlegustu svipgerðina af undirgerðunum 15. Í samantekt Alter, Rosenberg og Brody frá 2007 voru 27 tilfelli af FA-D1 greind með tilliti til arfgerðar og svipgerðar. Svipgerðir voru fjölbreyttar en einstaklingar höfðu almennt dæmigerð FA svipgerðareinkenni en oft í hærri tíðni. Það sem greindi þennan undirhóp frá öðrum er hversu snemma á lífsleiðinni og í hversu hárrí tíðni einstaklingarnir fá hvítbæði og önnur krabbamein. Uppsafnaðar líkur á að fá AML fyrir 10 ára aldur voru 79% og uppsafnaðar líkur á að fá önnur föst æxli 83% fyrir 6,7 ára aldur þar sem algengustu æxlin voru heilaæxli og Wilm's æxli. Uppsafnaðar líkur á að fá eitthvert krabbamein fyrir 5 ára aldur voru 97% (Alter, Rosenberg, & Brody, 2007).

1.1.2 Fanconi Anemia ferlið

Fanconi Anemia próteinin taka öll þátt í sama ferli sem kallað er Fanconi Anemia ferlið og hefur helst verið sýnt fram á að skipti miklu máli við viðgerðir á krosstengslum, ICL (interstrand crosslinks) í DNA. Krosstengsl í DNA geta myndast vegna innri þátta eins og niturgass eða aldehýða en einnig vegna utanaðkomandi þátta eins og útfjólublárrar geislunar eða Cisplatin og afleiðum þess. Ef ekkert er að gert geta krosstengsl heft ýmsa starfsemi tengda DNA eins og eftirmyndun og umritun (Noll, Mason, & Miller, 2006). FA frumur eru ofurviðkvæmar fyrir krosstengslum í DNA þar sem þær geta ekki gert við þau og komast því ekki fram hjá G2/M eftirlitsstöðvum frumuhingsins (Guervilly, Mace-Aime, & Rosselli, 2008).

Ferlið sjálf er nokkuð flókið. Öll FA próteinin 15 þurfa að vera til staðar svo að ferlið gangi rétt fyrir sig og til viðbótar eiga þau svo í samskiptum við mörg önnur prótein (mynd 1-1). FA ferlið virkjast þegar eftirmyndunarkvísl stöðvast við krosstengsl í DNA og ATR fosfórar nokkur FANC prótein sem virkjar þau. Átta prótein (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL og FANCM) mynda saman próteinklasa sem kallast FA kjarnaklasinn. Hann binst við DNA í eftirmyndunarkvíslinni í gegn um FANCM í samskiptum við FAAP24. Flest próteinin í FA klasanum hafa enga þekkta ensímvirgni og virðast því verka sem stuðningsnet við hin próteinin. Aðalpróteinið í klasanum er FANCL en endinn á því er PHD-líkt RING fingurshneppi. PHD hneppið á í samskiptum við UBE2T (E2 ubiquitin-conjugating enzyme) og stuðlar að því að FA kjarnaklasinn hefur ubiquitin-lígasa virkni (tekið saman af Kee & D'Andrea, 2012).



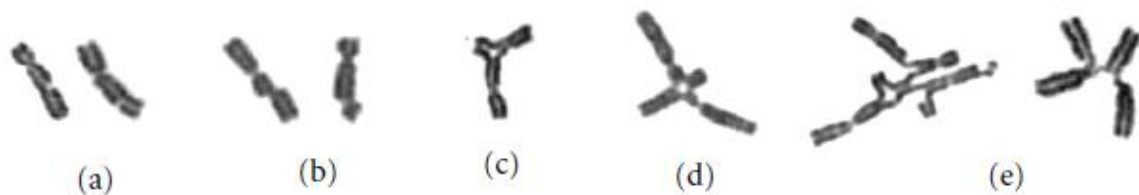
Mynd 1-1 Fanconi anemia/BRCA ferlið. FANC próteinin 15 eru græn en önnur prótein sem taka þátt í ferlinu eru rauð. 8 FANC prótein (A, B, C, E, F, G, L og M) mynda FA kjarnaklasann. Ferlið fer í gang þegar eftirmyndunarkvísl stöðvast við krosstengsl í DNA og FA kjarnaklasinn binst þar við DNA í gegn um FANCM og FAAP24. FANCL ubiquitinerar FANCI og FANCD2 sem er tvíliða sem binst við DNA nálægt krosstengslum. FANCI/D2 tvíliðan kallar svo á önnur FANC prótein sem taka þátt í viðgerðum á DNA; FANI og FANCP sem klippa í kring um krosstengslin og FANCD2, N, J og O sem taka þátt í endurröðunarviðgerð. USP1/UAF1 tvíliðan af-ubiquitinerar FANCI/D2 til að stöðva ferlið (þýtt og breytt úr D'Andrea, 2013).

Helsta hlutverk FA kjarnaklasans er að ubiquitinerar tvö FA prótein, FANCD2 og FANCI sem að mynda saman tvíliðu sem verkar sem merki til að kalla næstu prótein ferlisins

að DNA skemmdinni. Þau prótein eru t.d. FAN1 núkleasi og FANCP taka þátt í að klippa í kring um krosstengsl í DNA sem síðan er hægt að gera við með villugjörnum TLS (trans lesion synthesis) viðgerðum. FANCI/D2 kallar líka á FANCD1, FANCN, FANCI og FANCO sem taka öll þátt í endurröðunarviðgerðum (e. homologous recombination repair, HR) á DNA ásamt fleiri próteinum eins og BRCA1. HR gerir við tvíþátta brot á DNA en slík brot myndast einmitt sem millstig þegar verið er að gera við krosstengsl. Nánar verður farið í HR í umfjöllun um BRCA2 í kafla 1.2.2. USP1/UBAF1 tvíliðan af-ubiquitinerar FANCI/D2 til að stöðva ferlið (tekið saman af Kee & D'Andrea, 2012).

1.1.3 Sérstök einkenni FA frumna og greiningarpróf

Greining á FA hefur löngum reynst vandkvæðum háð þar sem klínísk einkenni eru fjölbreytt og skarast gjarnan við einkenni annarra heilkenna eða sjúkdóma. Mörg tilfelli greinast seint og líklegt þykir að mörg tilfelli séu aldrei greind (Auerbach, 2009). Til að staðfesta greiningu hefur verið gripið til sameindalíffræðilegra prófana á frumum og erfðaeftni sjúklinga. Greiningarprófið fyrir FA er kallað litningabrotapróf (e. chromosomal breakage analysis) og byggir á þeirri staðreynd að frumurnar eru mjög viðkvæmar fyrir krosstengjandi efnum. Við meðhöndlun FA frumna með t.d. mitomycin C, diepoxybútan eða cisplatin verður litningabrot og annarra galla eins og geislalitninga vart í miklum mæli (mynd 1-2) sem gefur sterklega til kynna að um FA sé að ræða (Oostra, Nieuwint, Joenje, & de Winter, 2012). Ástæða þessa er að frumurnar geta ekki gert við krosstengslin í DNA, tvíþátta brot safnast upp og valda miklum litningaóstöðugleika. Þar sem mörg krabbameinslyf og geislun verka einmitt á sama hátt getur reynst erfitt að meðhöndla krabbamein FA sjúklinga. Jafnframt er mikilvægt að þeir greinist áður en gripið er til slíkra meðferða því áhrifin geta verið mjög skaðleg.



Mynd 1-2 Dæmi um litningabrot í FA frumum eftir meðhöndlun með mitomycin C. a) Brot á öðrum litningsþræði b) Brot á báðum litningsþræðum c) Litningasamruni (þríarma geislalitningur) d) Litningasamruni (fjórarma geislalitningur) e) Litningasamrunar fjölda litninga (Breytt og þýtt úr Oostra et al., 2012).

Litningabrotaprófið getur þó brugðist. Yfirleitt eru eitilfrumur úr blóði notaðar í prófanirnar en sýnt hefur verið fram á að sómatísk mósaík sé til staðar í eitilfrumum um 10-30% FA-sjúklinga. Hjá þeim hefur orðið viðsnúningur í beinmergsstofnfrumu, t.d. stökkbreyting til baka eða endurröðun innan gens, svo að stökkbreytingin í annarri *FANCI* genasamsætunni er leiðrétt. Af þessu leiðir að hluti frumna í blóði eru arfblandnar og hafa starfhæft prótein svo þær sýna ekki litningaóstöðugleika við meðhöndlun með krosstengjandi efnum (Lo Ten Foe et al., 1997). Til að sporna við röngum niðurstöðum úr litningabrotaprófi hefur verið brugðið á það ráð að notast við fibróblasta úr húð sem sýna ekki merki um sams konar mósaík (Auerbach, 2003).

Eftir að greining á FA hefur verið staðfest með litningabrotaprófi þarf að greina um hvaða undirgerð FA er að ræða, en það getur veitt vísbendingar um mögulega sjúkdómsframvindu. Vegna fjölda *FANCI* genanna getur greining á undirgerðum verið tímafrek og flókin. Við þessar greiningar hafa meðal annars verið notuð uppbótarpróf þar FA

frumur eru ummyndaðar með retróveirum sem innihalda cDNA úr mismunandi FA undirgerðum (Chandra et al., 2005). Raðgreining er svo notuð til að finna nákvæmar stökkbreytingar í genunum sem um ræðir. Raðgreining er ekki heppileg á fyrri stigum greiningar vegna fjölda *FANC* genanna og einnig vegna þess að mörg genin eru stór og geta innihaldið margar stökkbreytingar svo og stór innskot og úrfellingar (Alter & Kupfer, 2013). Með hraðari og ódýrari raðgreiningaraðferðum hafa skapast ný tækifæri fyrir auðveldari greiningu á FA sem og öðrum sjúkdómum, til að mynda með raðgreiningu útraða (Knies et al., 2012).

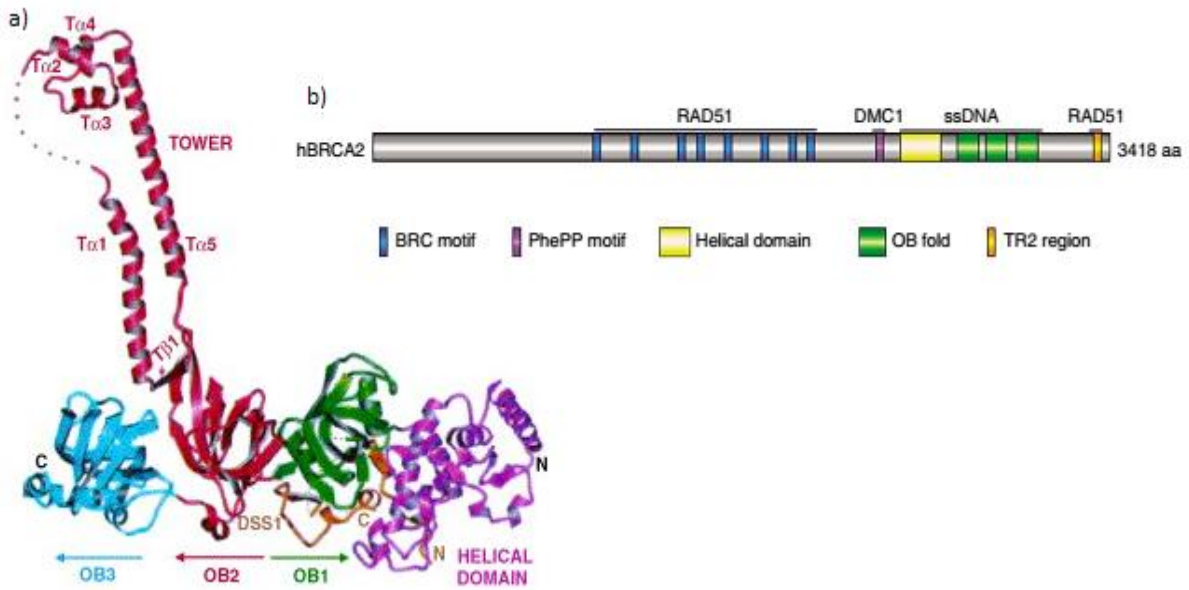
1.2 BRCA2 (FANCD1)

BRCA (Breast Cancer Susceptibility) genin tvö, *BRCA1* og *BRCA2*, eru mörgum kunn vegna tengsla skaðlegra stökkbreytinga í þeim við ættlæg brjóst- og eggjastokkakrabbamein. Fjöldi stökkbreytinga í *BRCA1* og *BRCA2* hafa verið tengdar við aukna áhættu á fyrrnefndum krabbameinum en algengi þeirra er almennt lágt (Fackenthal & Olopade, 2007). Undantekning á því eru landnemastökkbreytingar sem hafa hærra algengi í ákveðnum þjóðernishópum, svo sem 999del5 í *BRCA2* hjá Íslendingum (Thorlacius et al., 1996). Í *BRCA* ættlægum krabbameinum er önnur samsæta gensins óvirk vegna kímlínustökkbreytingar en til eru dæmi um að villigerðarsamsætan hafi tapað virkni sinni við sómatíska stökkbreytingu eða sé enn starfhæf, sem bendir til þess að genin séu tvísamsætuháð (e. haploinsufficient) (King et al., 2007). Nokkuð umdeilt er hvað stökkbreytingar í *BRCA1* og *BRCA2* valda mikilli aukningu í áhættu á að fá fyrrnefnd krabbamein en ljóst er að gerð stökkbreytinga og umhverfi eiga þar hlut að máli. Til að nefna dæmi mátu Antoniou og samstarfsfólk kímlínustökkbreytingar í annarri samsætu *BRCA1* valda að meðaltali 65% líkum á að fá brjóstakrabbamein og 39% líkum á að fá eggjastokkakrabbamein á lífsleiðinni. Aftur á móti voru kímlínustökkbreytingar í annarri samsætu *BRCA2* taldar valda að meðaltali 45% líkum á að fá brjóstakrabbamein og 11% líkum á að fá eggjastokkakrabbamein á lífsleiðinni (Antoniou et al., 2003).

1.2.1 BRCA2 próteinið og hlutverk þess

BRCA genin eru flokkuð sem æxlisbæligen og skrá fyrir mjög stórum próteinum sem taka þátt í HR (e. homologous recombination) endurröðunarviðgerðum á tvíþátta DNA brotum. Próteinin eru þrátt fyrir þetta mjög ólík og raunar ekkert skyld. Hér verður nánar fjallað um *BRCA2*.

BRCA2 genið er staðsett á litningi 13q12.3 og er 84188 basapör að lengd (NCBI, 2013). Próteinið er myndað frá 27 útröðum og er 3418 amínósýrur að lengd (Uniprot Consortium, 2013). Bygging *BRCA2* próteinsins hefur verið greind að hluta (~800 amínósýrur á C-enda) með röntgen-kristallagreiningu (Yang et al., 2002). Á þessu svæði *BRCA2* eru nokkur hneppi, fyrst er helix-hneppi á N-enda, síðan koma þrjú OB hneppi og helix-turn hneppi sem kemur út frá OB2 (mynd 1-3a). Talið er að OB hneppin ásamt helix-turninum bindi einþátta DNA. *BRCA2* inniheldur einnig 8 varðveittar BRC raðir ásamt TR-2 svæði á C-enda (mynd 1-3b) sem geta bundist við RAD51, eitt af lykilpróteinum í endurröðunarviðgerðum (Esashi, Galkin, Yu, Egelman, & West, 2007; Wong, Pero, Ormonde, Tavtigian, & Bartel, 1997). Þar að auki eru tvö NLS (nuclear localization signal) á C-enda *BRCA2* sem eru merki um að flytja eigi próteinið inn í kjarnann að lokinni þýðingu (Spain, Larson, Shihabuddin, Gage, & Verma, 1999).



Mynd 1-3 Bygging BRCA2. a) Myndin sýnir hluta BRCA2 próteinsins bundið við DSS1. BRCA2 hefur helix-hneppi og þrjú OB hneppi, helix-turn hneppi gengur út frá OB2. Talið er að OB hneppin ásamt helix-turn hneppinu geti bundist við einþátta DNA (Yang et al., 2002). B) Skematísk mynd af byggingu BRCA2. Próteinið hefur 8 BRC raðir sem binda RAD51 einliður, TR2 svæðið bindur RAD51 fjölliður. DMC1 binst við PhePP mótífið en próteinið er ásamt RAD51 nauðsynlegt við endurröðun í meiósu (Thorslund & West, 2007).

Eins og áður sagði er BRCA2 lykilprótein í HR sem er mikilvægt ferli í villufríum viðgerðum á tvíþátta brotum í DNA. Tvíþátta brot geta myndast við jónandi geislun eða DNA skemmandi efni en myndast einnig sem millistig í viðgerðum á krosstengslum í DNA. Ef þau eru til staðar geta eftirmyndunarkvíslar stöðvast og því er gert við tvíþátta brot með HR áður en fruman fer í mítósuskiptingu, þ.e. í S og G2 fösum frumuhingsins (Thorslund & West, 2007). Þar að auki hafa endurröðunarviðgerðir hlutverki að gegna við viðgerðir á stöðvuðum eftirmyndunarkvíslum og koma þeim þar með aftur af stað (Michel et al., 2001). HR spilar því stórt hlutverk við eftirmyndun erfðamengisins. Endurröðun á sér einnig stað í meiósu þar sem endónúkleasinn SPO11 veldur því að tvíþátta brot myndast. Þar stuðlar HR að endurröðun á milli litninga og þar með auknum erfðabreytileika (Thorslund & West, 2007).

HR ferlið fer af stað þegar tvíþátta brot virkjar ATM/ATR ferlið. Þá verður fosfórun á BRCA1 sem síðan virkjar DNA viðgerð með endurröðun með því að eiga samskipti við fjölda próteina. Eins og rætt var í kafla 1.1.2 getur FA ferlið einnig virkjað HR þegar krosstengsl eru í DNA. Fyrsta skrefið í HR er melting DNA í kring um brotið með MRN próteinklasanum (MRE11-RAD50-NBS1) sem skilur eftir einþátta DNA á 3'- þætti. Þarna binst RPA (Replication Protein A), sem er einþátta DNA bindiprótein, vindur ofan af DNA-inu og kemur í veg fyrir bindingu próteina á svæðinu. BRCA2 er nauðsynlegt fyrir einn af aðalviðburðunum í HR en það tekur þátt í að hlaða recombinasanum RAD51 upp á einþátta DNA sem húðað er með RPA. Til að miðla þessum áhrifum þarf að BRCA2 að mynda próteinklasa með PALB2/FANCN (Partner and Localizer of BRCA2) og BRCA1. Í framhaldinu stuðlar RAD51 að innrás DNA þáttarins á systurlitningsþráð sem notaður er sem mót við viðgerðina (tekið saman af Moynahan & Jasin, 2010; Thorslund & West, 2007)

BRCA2 hefur þó fleiri hlutverk en að hlaða RAD51 upp á DNA í endurröðunarviðgerð. Árið 2011 lýstu Schlacher og samstarfsfólk hlutverki BRCA2 við verndun stöðvaðra

eftirmyndunarkvísla með því að verja þær gegn niðurbroti vegna MRE11. C-ter (TR-2) svæðið á C-enda BRCA2 hefur hlutverki að gegna við að stöðga RAD51 fjölliður en tekur ekki þátt í að hlaða RAD51 einliðum upp á DNA eins og BRC endurtekningarnar. Þau sýndu fram á að þetta svæði er nauðsynlegt fyrir verndun eftirmyndunarkvísar gegn niðurbroti með núkleösum eins og MRE11 en má missa sín við endurröðunarviðgerðir (Schlacher et al., 2011). Í ljósi þess að BRCA2 er FA prótein hafa verndunarhlutverk annarra FA próteina við stöðvaðar eftirmyndunarkvísar verið rannsökuð. Í ljós kom að ubiquitinerað FANCD2, sem getur bundist BRCA2, tekur þátt í ferlinu sem og BRCA1 og margt bendir til þess að fleiri prótein komi þar að (Schlacher, Wu, & Jasin, 2012).

Að lokum má nefna að nýlega var uppgötvað að BRCA2 hefði hlutverki að gegna við verndun og viðhald telomera (rætt nánar í kafla 1.3.4) (Badie et al., 2010).

1.2.2 Gallar í BRCA2 og tengsl við litningaóstöðugleika

Margar rannsóknir hafa sýnt tengsl á milli galla í BRCA2 og litningaóstöðugleika, en litningaóstöðugleiki getur leitt til krabbameinsmyndunar. Til að nefna dæmi hafa *Brca2*^{-/-} MEFs (mouse embryonic fibroblasts) alvarlega litningagalla án utanaðkomandi áhrifavalda (Badie et al., 2010; Patel et al., 1998) og eitiilfrumur úr músum með gölluðu *Brca2* próteini sýndu bæði alvarlega sjálfsprottna litningagalla með og án meðhöndlunar með krosstengjandi efnum (Yu et al., 2000). Jafnframt hefur verið sýnt fram á alvarlega litningagalla í frumum úr brjóstaaæxlum með ættlæga *BRCA2* stökkbreytingu (Gretarsdottir et al., 1998). Litningagallar sem hafa sést í *BRCA2* stökkbreyttum frumum í fyrrgreindum rannsóknum eru t.d. litningabrot á báðum eða öðrum systurlitningsþræði, þrí- og fjórarma geislalitningar, yfirfærslur og úrfellingar auk endatenginga litninga.

Eins og áður sagði er HR mikilvæg leið fyrir villufríar viðgerðir á tvíþátta brotum í DNA í G2 og S fösum frumuhingsins. Þegar BRCA1, BRCA2 eða önnur prótein sem taka þátt í HR eru ekki til staðar óvirkjast ferlið eða virkni þess skerðist. Til að bæta upp fyrir það taka önnur DNA viðgerðarkerfi, sem eru yfirleitt mun villugjarnari, við keflinu. NHEJ (Non-Homologous End Joining) er eitt þeirra en það er það kerfi sem gerir helst við tvíþátta brot ásamt HR. NHEJ viðgerð er nánast einungis notuð við viðgerðir á tvíþátta brotum í G1 fasa og tekur ekki þátt í því að koma stöðvuðum eftirmyndunarkvísulum af stað aftur líkt og HR. Ferlið felst í því að tengja saman brotna enda og NHEJ er mun villugjarnara ferli en HR. Þegar ekki er gert við tvíþátta brot á DNA sem skildi aukast líkur á litningabrenslum til muna (Thorslund & West, 2007).

Hlutverk BRCA2 við verndun stöðvaðra eftirmyndunarkvísla er einnig mikilvægt fyrir stöðugleika erfðamengisins. Ef BRCA2 er ekki til staðar er eftirmyndunarkvíslin brotin niður af núkleösum með MRE11 fremstan í flokki en það veldur miklum litningabrenslum (Schlacher et al., 2011). Þar sem FA ferlið hefur verið tengt við þessa virkni er líklegt að FA og BRCA prótein verndi og stöðgi eftirmyndunarkvísar sem stöðvast við krosstengsl í DNA og stuðli þannig að auknu aðgengi fyrir núkleasa og önnur prótein sem meðhöndla krosstengsli til undirbúnings fyrir áframhaldandi viðgerðir (Schlacher et al., 2012).

Nýlega hefur verið sýnt fram á viðhalds- og verndunarhlutverk BRCA2 við telomera (Badie et al., 2010) en viðhald telomera er nauðsynlegt fyrir stöðugleika erfðamengisins (Palm & de Lange, 2008). Það er því ekki aðeins hlutverk BRCA2 í endurröðunar-viðgerðum á DNA og stuðningi við eftirmyndunarkvísar sem stuðlar að litningastöðugleika heldur einnig hlutverk próteinsins við telomera (nánar í kafla 1.3.4).

1.2.3 Tenging FA og BRCA ferlanna

FANC genin hafa verið greind hvert af öðru á síðustu árum og eru nú 15 talsins. Lengi vel var þó ekki vitað hvaða gen lægi að baki FA-D1 undirgerðinni. Árið 2002 var staðfest að einstaklingar með FA-D1 höfðu stökkbreytingar í báðum samsætum *BRCA2* gensins (Howlett et al., 2002) og var þar með komin tenging á milli FA og BRCA ferlanna. Í framhaldinu voru fleiri prótein sem taka þátt í BRCA ferlinu greind sem FANC prótein og gefin heiti í samræmi við það; PALB2 sem FANCN, BRIP1 sem FANCJ og RAD51C sem FANCO (Kee & D'Andrea, 2012). FA og BRCA ferlarnir vinna sem sagt saman við viðgerðir á krosstengslum í DNA og við verndun stöðvaðra eftirmyndunarkvísla fyrir niðurbroti (Schlacher et al., 2012)

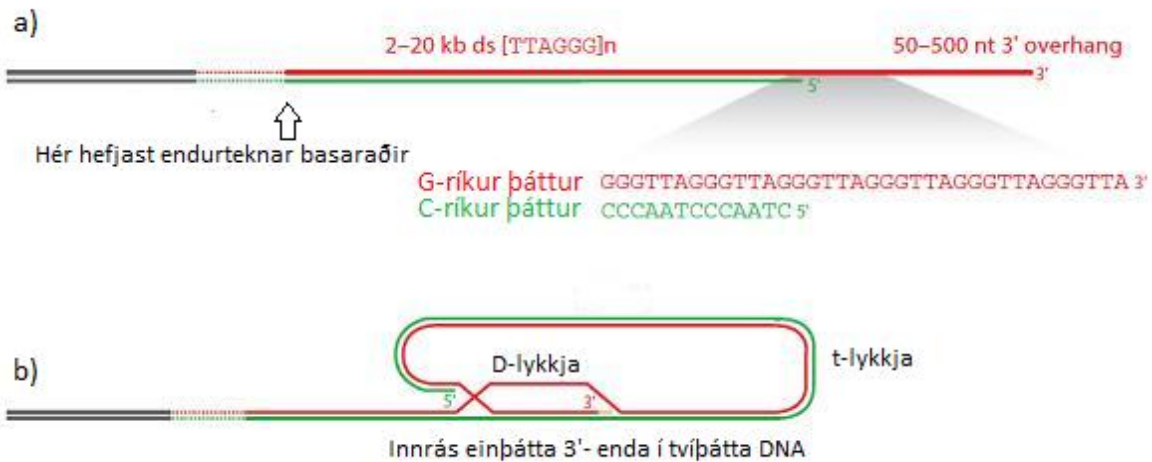
Nýlega var birt tilfelli þar sem ung kona með krabbamein í eggjastokkum var greind með stökkbreytingar á báðum samsætum í *BRCA1*. Hún hafði einnig ýmis svipgerðareinkenni sem eru dæmigerð fyrir FA sem gefur til kynna að flokka megji *BRCA1* sem *FANC* gen (Domchek et al., 2013). Hingað til hefur það ekki verið talið lífvænlegt í mönnum að hafa stökkbreytingar á báðum samsætum *BRCA1* gensins en burt séð frá því þurfa þessar niðurstöður ekki að koma á óvart. *BRCA1* er hluti af próteinklasa sem inniheldur einnig *BRCA2*, *PALB2* og *BRIP1* (sjá mynd 1-1) sem eins og áður sagði eru öll flokkuð sem FANC prótein en jafnframt eru gallar í þeim einnig tengdir við aukna áhættu og brjóst- og eggjastokkkrabbameinum (D'Andrea, 2013).

1.3 Telomerar

Telomerar eru endurteknar basaraðir ásamt bundnum próteinum á endum línulegra litninga flestra heilkjörnunga. Hlutverk telomera er að hjúpa litningaendana og vernda þá jafnframt fyrir niðurbroti og samruna við aðra litninga sem gæti stuðlað að litningaóstöðugleika. Í hverjum frumuhring styttest telomerar vegna vandræða eftirmyndunarkerfis frumunnar til að eftirmynda þá og hafa afleiðingar þessa m.a. verið tengdar við öldrun og krabbameinsmyndun.

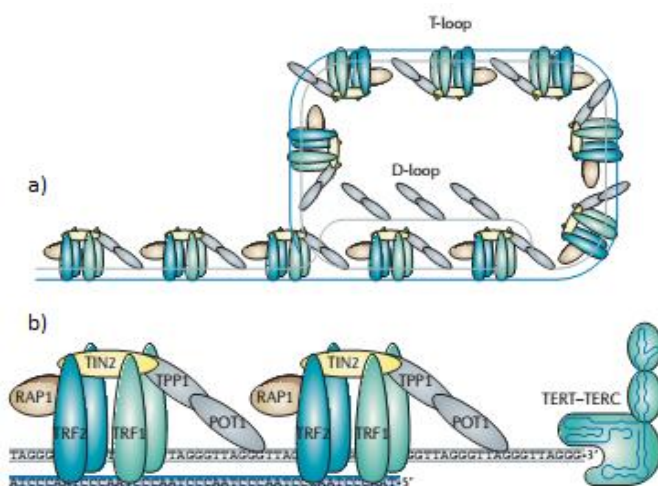
1.3.1 Bygging og hlutverk telomera

Á endum litninga eru endurteknar basaraðir sem ásamt bundnum próteinum mynda telomera. Í manningnum hafa endurteknu basaraðirnar röðina (TTAGGG)_n (Moyzis et al., 1988) og eru yfirleitt um 10-15 kb að lengd. Á 3'- enda GT-ríka þáttarins er 50-500 basa einþátta röð (mynd 1-4a). Þessi einþátta röð sveigist aftur og ræðst inn á tvíþátta DNA svæði frammar á telomeranum, ryður G-ríka þættinum í burtu og basaparast við C-ríka þáttinn. Svæðið kallast D-lykkja (e. displacement loop) en við sveigjuna myndast einnig lykkja á litningaendanum sem kallast t-lykkja (mynd 1-4b). t-lykkjan verndar litningaendann fyrir hinum ýmsu viðgerðarkerfum frumunnar, DDR (DNA damage response), með því að „fela“ litningaendann sem annars gæti verið meðhöndlaður sem tvíþátta litningabrot (Griffith et al., 1999).



Mynd 1-4 Bygging telomera. a) Á endum litninga í mönnum eru endurteknaðar $(TTAGGG)_n$ basaraðir sem eru mislangar eftir einstaklingum. Á enda 3'-þáttarins er löng, einþátta, G-rík basaröð sem hefur ekki fastákvarðaða endingu en 5'-þátturinn endar alltaf á ATC-5'. b) Skematísk mynd af byggingu t-lykkju og D-lykkju, sem myndast við innrás einþátta 3'-endans á tvíþátta DNA framur á litningaendanum (breytt og þýtt úr Palm & de Lange, 2008).

Próteinklasinn sem binst telomere-endurtekningum kallast shelterin en hann gegnir lykilhlutverki við verndun telomera og stjórnun á virkni telomerasa eins og fjallað verður um síðar. Í shelterin próteininklasanum eru TRF1 og TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factor 1 og 2), POT1 (Protection of Telomeres 1), TIN2 (TRF2- and TRF1-Interacting Nuclear protein 2), TPP1 og Rap1 (samsvarandi gersvepps-próteininu Repressor/Activator Protein 1). Shelterin hefur gríðarlega mikla sértækni fyrir telomereum þar sem þrjú af próteinunum hafa bindisértækni fyrir telomere-raðir. TRF1 og TRF2 bindast sem einsleitar tvíliður við raðir sem innihalda TTAGGG á tvíþátta DNA en POT1 binst við svipaðar raðir á einþátta DNA (þ.e. í D-lykkju og á einþátta 3'-þætti). TIN2 og TPP1 tengja svo POT1 við TRF1 og TRF2, Rap1 tengist hins vegar einungis TRF2 (mynd 1-5). Á telomereum má einnig finna ýmis önnur prótein sem mörg hver taka þátt í DNA viðgerðarferlum (tekið saman af de Lange, 2005a).



Mynd 1-5 Shelterin próteinklasinn a) Skematísk mynd af shelterin bundnu við t-lykkju. b) Skematísk mynd af próteinum bundnum við telomere-raðir. Shelterin próteinklasinn binst við telomera á t-lykkju. Shelterin samanstendur af TRF1 og TRF2 sem bæði bindast sem einsleitar tvíliður við tvíþátta telomere-raðir, POT1 sem binst við einþátta telomere-raðir, TIN2 og TPP1 sem tengja saman TRF1/2 og POT1 og loks Rap1 sem tengist við TRF2. Ensímið telomerasi sem getur lengt telomera sést lengst til hægri, það hefur tvær megin undireiningar; TERT og TERC (breytt og þýtt úr Martinez & Blasco, 2011).

Hlutverk shelterin próteinklasans á telomerum er margþætt. Hann stuðlar að skilvirkri eftirmyndun telomere-raða, tekur þátt í nýmyndun telomere-raða með því að kalla á telomerasa og síðast en ekki síst stuðlar hann að myndun t-lykkju og verndar telomera þar með fyrir ýmsum viðgerðarferlum frumunnar.

Talið er að telomere-raðir séu erfiðar í eftirmyndun vegna mikilla G endurtekninga sem myndi G4 quadruplex-a og að þetta geti valdið því að eftirmyndunarkvíslin stöðvist reglulega á telomere-svæðum. Sýnt hefur verið fram á að eðlileg eftirmyndun á telomere-svæðum í S-fasa þarfnast TRF1 sem líklega miðlar þessari virkni með því að kalla á BLM og RTEL1 sem eru helikasar sem geta fjarlægt G4 DNA (Sfeir et al., 2009)

Shelterin prótein hafa einnig hlutverk við að viðhalda lengd telomera með því að kalla á telomerasa. Telomerasi getur bætt kirnum við litningaenda sem annars styttest í hverjum frumuhring (sjá í næsta kafla). Rannsóknir hafa sýnt að það er TPP1 sem ásamt öðrum próteinum tekur þátt í að kalla telomerasa til telomeranna (Abreu et al., 2010).

TRF2 getur hvatað myndun t-lykkju á telomerum (Stansel, de Lange, & Griffith, 2001) og þar með ákvarðað byggingu litningaendans og „falið“ hann fyrir þeim viðgerðarferlum frumunnar sem gætu álitid hann vera tvíþátta brot. Til að mynda t-lykkju þarf að vera einþátta röð á 3'- þættinum, talið er að hún myndist við meltingu hins þáttarins með núkleösom sem TRF2 kallar á rétt eftir eftirmyndun (Wu, van Overbeek, Rooney, & de Lange, 2010). Mismunandi shelterin undireiningar hafa svo hlutverk við að bæla ATM/ATR kinasabodleiðir sem stuðla að viðgerðum á tvíþátta brotum með NHEJ og HR, stöðvun frumuhringsins eða frumudaða (tekið saman af Martinez & Blasco, 2011).

1.3.2 Eftirmyndunarvandamál litningaenda og telomerasi

Áður en fruma skiptir sér þarf hún að tvöfalda allt erfðaeftni sitt. Ferlið hefst með myndun eftirmyndunarkvíslar sem myndast þegar helikasar rjúfa vetnistengi á milli basa í DNA sameind svo þættirnir aðskiljast. Nokkrir pólýmerasar sjá um eftirmyndun DNA í mönnum en þeir vinna í 5'-3' stefnu með því að bæta nýju kirni við 3'-OH hóp á næsta kirni fyrir framan. Þáttapörun við basa í sömu stöðu á þættinum sem verið er að eftirmynda stjórnar því hvaða gerð kirnis er bætt við. DNA pólýmerasi getur hins vegar ekki hafið eftirmyndun án þess að hafa vísi með 3'-OH enda. DNA prímasi hvatar myndun stuttra RNA vísa sem þáttaparast við DNA mótið og DNA pólýmerasi getur eftirmyndað frá. RNA í vísunum er síðan skipt út fyrir DNA og lígasi hvatar hvarf sem tengir DNA raðirnar saman. Þar sem DNA pólýmerasi getur aðeins eftirmyndað í 5'-3' átt eru DNA þættirnir myndaðir á mismunandi hátt. Leiðandi þáttur (e. leading strand) er myndaður í 5'-3' stefnu og því nægir að mynda einn RNA vísi sem pólýmerasinn getur svo prjónað við til enda þáttarins. Fylgjandi þátt (e. lagging strand) þarf hins vegar að mynda í 3'-5' stefnu. Því til úrlausnar myndar RNA prímasi vísa með reglulegu millibili (á u.þ.b. 200-400 basa fresti) og DNA pólýmerasi fyllir upp í götin í 5'-3' stefnu eins og áður var lýst. Þetta kallast Okazaki bútar (Watson et al., 2008).

Á telomerum lendir DNA pólýmerasinn í vanda með að klára eftirmyndun á fylgjandi þætti því það vantar vísi á endann. Afleiðing þessa er að einþátta röð verður eftir á 3'- þættinum og telomeras styttest um 100-200bp í hverjum frumuhring (Levy et al., 1992). Til er lausn við þessu vandamáli því ensímið telomerasi getur bætt kirnum við 3'- þátt DNA á telomerum (Greider & Blackburn, 1985). Telomerasi er hins vegar aðeins tjáður í stofnfrumum, kynfrumum karlmannna, virkjuðum eitilfrumum og snemmstigum þroskunar og því er stytting telomera í hverjum frumuhring í flestum líkamsfrumum staðreynd (Wright, Piatyszek, Rainey, Byrd, & Shay, 1996).

Telomerasi hefur tvær megin undireiningar; TERC (telomerase RNA component) sem er RNA sameind með röðina 5'-AAUCCCAAUC-3' og TERT (telomerase reverse

transcriptase) sem er víxlriti. Telomerasi binst telomerum með þáttapörun TERC við 3'-enda einþátta raðarinnar. Hluti RNA raðar TERC stendur út af endanum og er hún notuð sem mót við lenginu 3'-þáttarins með TERT. Telomerasinn færir svo á ný á enda 3'-þáttarins og endurtekur ferlið. Þegar 3'-endinn hefur verið lengdur með telomerasa er 5'-þátturinn lengdur með Okazaki-bútum eins og áður var lýst (Watson et al., 2008).

1.3.3 Telomere-gallar, öldrun og krabbamein

Telomere-raðir þurfa að vera af ákveðinni lágmarkslengd til að t-lykkja geti myndast og shelterin próteinklasinn geti bundist við raðirnar. Þar sem telomerasar stytta í hverjum frumuhring í líkamsfrumum kemur að því að þessari lágmarkslengd er ekki lengur náð svo að shelterin geta ekki bundist við telomerana og verndað þá (Martinez & Blasco, 2011). Afleiðingarnar geta verið tvenns konar, frumuöldrun eða frumudauði annars vegar eða viðgerðir með NHEJ eða HR hins vegar.

Í heilbrigðum frumum með virkar eftirlitsstöðvar í frumuhringnum leiðir styttingin til virkjunar á ATM/ATR kinasabodferlum og öðrum próteinum tengdum stjórnun frumuhringsins sem geta stöðvað frumuhringinn eða leitt til frumudauða (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Frumuöldrun verður í kjölfar stöðvunar frumuhringsins því þó frumurnar séu lifandi breytist t.d. tjáning gena og seyti frumunnar sem veldur m.a. breytingum í vefjum. Mögulegt er að þetta sé einn af áhrifavöldum öldrunar hjá fólki því frumur líkamans hafa aðeins ákveðinn líftíma þar sem telomerasar stytta við frumuskiptingar (Shay & Wright, 2005).

Í þeim frumum sem hafa óvirkar eftirlitsstöðvar í frumuhringnum, eða hafa leiðir til að koma sér fram hjá þeim, halda frumurnar áfram að skipta sér þrátt fyrir að telomerasarnir stytta. Litningaendar eru þá meðhöndlaðir sem tvíþátta brot sem gert er við af viðgerðarferlinu NHEJ, sem veldur endatengingum litninga, eða með endurröðunarviðgerðum (HR). Með fleiri frumuskiptingum aukast litningabrenslanir svo sem endatengingar litninga og litningabrot stöðugt sem valda aukinni hættu á krabbameinsmyndun. Flestar krabbameinsfrumur komast hjá frumuöldrun og frumudauða með því að tjá telomerasa sem er í ósamræmi við þá staðreynd að stytting-telomera (og þá vöntun á telomerasa) leiði til krabbameinsmyndunar. Rannsóknir hafa hins vegar sýnt að áður en tjáning telomerasa hefst í krabbameinsfrumum hafi þær gengið í gegn um tímabil mikils litningaóstöðugleika vegna galla á telomerum (de Lange, 2005b).

1.3.4 Hlutverk BRCA2 við telomera

Hlutverk BRCA2 við telomera hafa nýlega verið kynnt til sögunnar en sýnt hefur verið fram á að BRCA2 tekur þátt í viðhaldi og verndun telomera með því að stuðla að HR á telomere-svæðum. BRCA2 tengist við telomera í S og G2 fösum frumuhringsins og stuðlar að því að RAD51 er hlaðið upp á telomera á sama hátt og áður var þekkt (Badie et al., 2010). HR ferlið er nauðsynlegt fyrir viðhald á telomerum því það útvegar leið til lengingar á telomerum (alternative lengthening of telomeres, ALT) án þess að telomerasa sé þörf (Dunham, Neumann, Fasching, & Reddel, 2000). HR stuðlar einnig að verndun telomera með því að auðvelda myndun á t-lykkju (Verdun & Karlseder, 2006).

Af þessu leiðir að óstöðugleiki í erfðamenginu vegna stökkbreytinga í *BRCA2* er ekki einungis vegna galla í HR við viðgerðir á tvíþátta brotum eða vegna óverndaðra stöðvaðra eftirmyndunarkvísla heldur einnig vegna telomere-galla í þessum frumum. Badie og samstarfsfólk (2010) sýndu fram á að í *Brca2*^{-/-} MEFs (mouse embryonic fibroblasts) verður mikil stytting á telomerum sem bendir til galla í viðhaldi á lengd telomera. Stytting á telomerum í þessum frumum orsakast líklega af því að í S-fasa getur eftirmyndunarkvíslin

hökt eða stöðvast á G-ríkum telomere-röðum og við það geta myndast tvíþátta brot í DNA. Þar sem HR er ekki virkt í þessum frumum er ekki gert við brotin, eftirmyndunarkvíslin kemst ekki aftur af stað og raðirnar styttast. Jafnframt sýndu þeir fram á að verndun telomera er ábótavant í þessum frumum þar sem uppsöfnun varð á γ H2AX við telomera. γ H2AX er merki um tvíþátta brot á DNA og einnig skemmda telomera (Takai, Smogorzewska, & de Lange, 2003) enda komu ýmsar litningabrenslanir fram svo sem MTS, tap á telomere-röðum, litningabrot og endatengingar litninga sem gefa til kynna að gallar séu til staðar við verndun telomera (telomere capping defect). Uppsöfnun á slíkum litningabrenslunum getur leitt til myndunar krabbameina.

1.4 Undanfari og markmið verkefnis

Á Rannsóknarstofu í krabbameinsfræðum við læknadeild Háskóla Íslands hafa lengi verið stundaðar rannsóknir á brjóstakrabbameinum sem beinast sérstaklega að þeim æxlum og einstaklingum sem hafa stökkbreytingar í geninu *BRCA2*. Jafnframt hefur hlutverk *BRCA2* gensins sjálfs og próteinafurðar þess verið mikið rannsakað. Síðustu misseri hefur áhersla verið á rannsóknir á telomerum og eru þær rannsóknir enn í fullum gangi.

Sigríður Klara Böðvarsdóttir hafði í doktorsverkefni sínu og áframhaldandi rannsóknum meðal annars rannsakað litningabrenslu og telomere-galla í *BRCA2* stökkbreyttum æxlum og brjóstakjufurumúlínum úr arfberum með því að notast við karyótýpugreiningar, FISH (Fluorescence *in situ* Hybridisation) og CO-FISH (Chromosome Orientation-FISH). Niðurstöður þessara rannsókna sýndu glögg tilmæli um ýmiss konar litningabrenslu og telomere-galla í mun hærri tíðni en í viðmiðunarsýnum (sjá Bodvarsdóttir, Steinarsdóttir, Bjarnason, & Eyfjörð, 2012) sem benti til þess að *BRCA2* hefði hlutverki að gegna við viðhald og verndun telomera. Þessar niðurstöður studdu við líkar niðurstöður annarra rannsókna sem birtar voru um svipað leiti (Badie et al., 2010). Í mastersverkefni sínu skoðaði Hörður Bjarnason sams konar galla í eitilfrumum úr blóði einstaklinga sem voru arfblendnir með tilliti til stökkbreytinga í *BRCA2* og niðurstöður þeirra rannsókna eru væntanlegar bráðlega.

Eitt af þeim atriðum sem þótti eftirtektarvert í ofangreindum rannsóknum var að telomere-raðir innan litninga (ITS) voru mun algengari í arfblendnu brjóstakjufurumúlínunum heldur en í viðmiðunarfurum og ALT furmlínunum (Bodvarsdóttir et al., 2012). Því vaknaði í framhaldinu upp sú spurning hvernig þessu væri varið í frumum sem hefðu skaðlegar stökkbreytingar á báðum *BRCA2* samsætum, þ.e. í FA-D1 frumum. Markmið þessa verkefnis í upphafi var því að kanna telomere-raðir innan litninga í eitilfrumum úr blóði tveggja FA-D1 einstaklinga en vatt fljótlega upp á sig og tók auk þess til fleiri litninga- og telomere-galla hjá sama hópi.

2 Efni og aðferðir

2.1 Frumulínur

Notaðar voru FA-D1 frumulínurnar Nord og Span auk viðmiðunarfrumulínunnar EB392. Þær tvær fyrrnefndu eru eitilfrumulínur úr einstaklingum með FA-D1 sem hafa verið gerðar ódauðlegar með EBV (Epstein-Barr veira) og fengust sendar frá Helmut Hanenberg, prófessor við Háskólann í Düsseldorf, Þýskalandi, og Indiana háskóla í Bandaríkjunum. FA-D1 tilfellingin eru bæði óbirt. Span hefur stökkbreytingarnar 1825delA, sem veldur stöðvun umritunar vegna stopptákna svo starfhæft prótein myndast ekki, og úrfellingu á útröðum 15 og 16 í hinni samsætu *BRCA2*. Úrfelling á útröðum 15 og 16 er á HD svæði (helical domain) sem er það svæði *BRCA2* próteinsins sem binst DNA (NCBI, 2013). Nord hefur stökkbreytingarnar 886delGT og 8447T>G (L2740X) í *BRCA2* sem báðar valda stöðvun umritunar vegna stopptákna. EB392 er eitilfrumulína úr heilbrigðum einstaklingi sem gerð hefur verið ódauðleg með EBV.

2.2 Frumurækt

Span og Nord höfðu reynst erfiðar í ræktun og voru því samkvæmt tilmælum ræktaðar í vökvarækt í RPMI 1640 æti (Gibco®) með penicillin/streptomycin og 10-20% óafvirkjuðu FBS (fetal bovine serum) við 37°C og 5% CO₂. Nægilegt var að nota 10-15% óafvirkjað FBS fyrir NORD en SPAN uxu einungis við 20% óafvirkjað FBS. Skipt var um æti á 2-3 daga fresti og frumur taldar reglulega.

Upphaflega var önnur viðmiðunarfrumulína rækтуð við sömu aðstæður en reyndist ekki nothæf og því voru tilbúnar FISH-myndir fengnar frá Herði Bjarnasyni af EB392. Þær frumur höfðu verið ræktaðar í vökvarækt í RPMI 1640 æti með penicillin/streptomycin og 20% FBS í upphafi sem síðan var minnkað niður í 10% við 37°C og 5% CO₂.

Allar frumur voru ræktaðar þangað til þær náðu nægum fjölda fyrir litningaheimtur sem var miðaður við um 4 milljónir frumna.

2.3 Litningaheimtur

Þegar tilskildum fjölda frumna hafði verið náð var skipt um æti á frumunum eins og venjulega en colcemid (10µg/ml Karyo®MAX Colcemid, Invitrogen®) bætt út í, 8µl fyrir hvern ml af frumum, og látið standa í 4 klst við 37°C og 5% CO₂. Colcemid stoppar frumurnar í metafasa mítósu sem er sá fasi í frumuhringnum þar sem litningarnir eru þéttastir og því sem best sjáanlegir. Litningar í metafasa eru því iðulega notaðir í hinar ýmsu cytogenísku greiningar. Næst voru frumurnar spunnar niður við 1500 rpm í 10 mín og vökvi fjarlægður. Því næst voru frumur sprengdar með hypotónískri meðhöndlun með 7 ml af 0,075 KCl sem sett var á frumubotnfallið, þetta var látið standa við herbergishita í 10 mín. Að því loknu var 1 ml af nýtilbúnum fixative (3 hlutar absolute metanól / 1 hluti ísediksýra) bætt út í og spunið niður við 1500 rpm í 10 mín. Vökvi var fjarlægður og botnfallinu blandað varlega við fixative á vortexi, dropa fyrir dropa upp að 4 ml. Þetta var síðan spunið eins og áður við 1500 rpm í 10 mín, vökvi fjarlægður og síðasta skref framkvæmt aftur nema í þetta sinn var fixative bætt við

upp að 3 ml. Eftir að þetta hafði verið spunnið niður eins og áður og vökvi fjarlægður var örlítið af fixer bætt við þangað til að lausnin leit út fyrir að vera örlítið skýjuð. Að lokum var litningum dreift á gler með því að láta dropa falla á ískalt smásjargler úr ca. 15 cm hæð.

2.4 FISH

Til að geta greint telomere-galla var notast við FISH (Fluorescent in Situ Hybridisation) aðferðina en í henni er notast við flúrljómandi þreifara til að gera DNA raðir sýnilegar. Til að gera talningu á litningum auðveldari og til að meta endatengingar á milli litninga var notaður grænn þreifari fyrir þráðhöft (FITC conjugated centromere probe frá Dako) en rauður þreifari (CCCTAA)_n fyrir telomera (úr Telomere PNA FISH kit/Cy3 K5326 frá Dako). Protocol frá Panagene var fylgt að mestu leiti, hér fylgir nákvæm aðferðalýsing:

Á hvern dropa á gleri sem var litaður voru settir 5µl af telomere þreifara en 3 µl af þráðhaftaþreifaranum. Síðan var þekjugler límt yfir, til að halda glerinu röku svo bufferinn gufi ekki upp, og sett í eðlissviptingu við 80°C í 5 mín. Því næst var sýnið sett í DNA þáttatengingu í 2 klst við herbergishita í myrkri og séð til þess að nægur raki væri undir glerinu. Næst voru þekjugler tekin af og smásjarglerin þvegin. Í fyrsta þvotti var glerjunum dýft í 1xPBS með 0,1% Tween-20 við herbergishita. Næst voru glerin skoluð í sömu lausn við 57°C í 20 mín. Að lokum voru glerin þvegin í lausn sem innihélt 2xSSC og 0,1% Tween-20 við herbergishita í um 1 mín og látin þorna. Dapi litun var notuð til að gera litningana sjálfa sjáanlega með bindingu beint við kjarnsýrur (mount glyceról-lausn með 0,15 mg/ml 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI)).

2.5 Myndataka, meðhöndlun mynda og aflestur

Sýni voru mynduð í flúrsmásjá á litningadeild Landspítala Íslands. Teknar voru þrjár myndir af hverjum metafasa við mismunandi bylgjulengdir og þær síðan settar saman í eina heildarmynd (DAPI filter: 358 nm, Cy3 filter: 550 nm og FITC filter: 493 nm). Í töflu 2-1 má sjá helstu atriði sem skoðuð voru við aflestur mynda.

Tafla 2-1 Atriði sem skoðuð voru við aflestur mynda. Heiti á ensku og þær skammstafanir sem notast er við í áframhaldandi umfjöllun ásamt útskýringum

Enskt heiti	Skammstöfun	Útskýring*
Single telomere loss	STL	Tap á telomere-merki á litningaenda annars systurlitningsþráðar
Telomere free end	TFE	Litningaendi án telomere-merkja
Multiple telomeric signal	MTS	≥2 telomere-merki á litningaenda annars systurlitningsþráðar
Double multiple telomeric signal	DMTS	≥2 telomere-merki á litningaendum beggja systurlitningsþráða
Interstitial telomere sequences	ITS	Telomere-merki innan litnings

*Sjá má nánari útskýringar á myndum í niðurstöðukafla

Talið var hversu oft viðkomandi atriði kom fyrir í hverjum metafasa. Litningar í metafösum voru taldir og hver þessara þátta var ákvarðaður á hvern litningaenda nema ITS sem var talið á hvern litning. Auk þeirra fimm grunnatriða sem talin eru upp í töflu 2-1 voru önnur áhugaverð atriði skráð svo sem litningabrot með eða án telomere merkja, telomere-merki utan litninga, litningar með fleiri en eitt þráðhaft sem eru líklega af völdum endatenginga litninga

(chromosome end to end fusions (CEFs)), tengingar milli systurlitningsþráða (sister chromatid fusions (SCFs), geislalitningar o.fl.

Þar sem litningaeinangrun og FISH tókust ekki sem skildi fyrir viðmiðunarsýnið úr NC198 var notast við myndir úr öðru viðmiðunarsýni, EB392, frá Herði Bjarnasyni. Til að tryggja sambærilegan aflestur var lesið á ný úr þeim myndum.

2.6 Tölfræðileg úrvinnsla og meðhöndlun gagna

Við meðhöndlun gagna og tölfræðilega úrvinnslu var notast við töflureikninn Microsoft Excel[®] 2010. Meðaltöl af tíðni hverrar gerðar telomere-brenslana í FA-D1 frumulínunum tveimur, Span og Nord, voru borin saman við tíðni þeirra í viðmiðunarsýninu, EB392, með því að nota tvíhliða t-próf. Með þessu tölfræðiprófi má prófa mun á milli tveggja meðaltala og athuga hvort munurinn sé marktækur miðað við fyrirfram ákveðin skilyrði. Hér var $\alpha=0,05$, þ.e. p-gildið skilgreint sem marktækt ef það var lægra en 0,05.

Til að meta hvort munur væri marktækur á hlutfalli metafasa með telomere-raðir utan litninga eða litningabrenslanir svo sem litningabrot eða litningasamruna í FA-D1 frumum og viðmiðunarfrumum var notast við Z-próf. Í því prófi er hægt að athuga mun á milli tveggja hlutfalla. Eins og áður var p-gildið skilgreint sem marktækt ef það var lægra en 0,05.

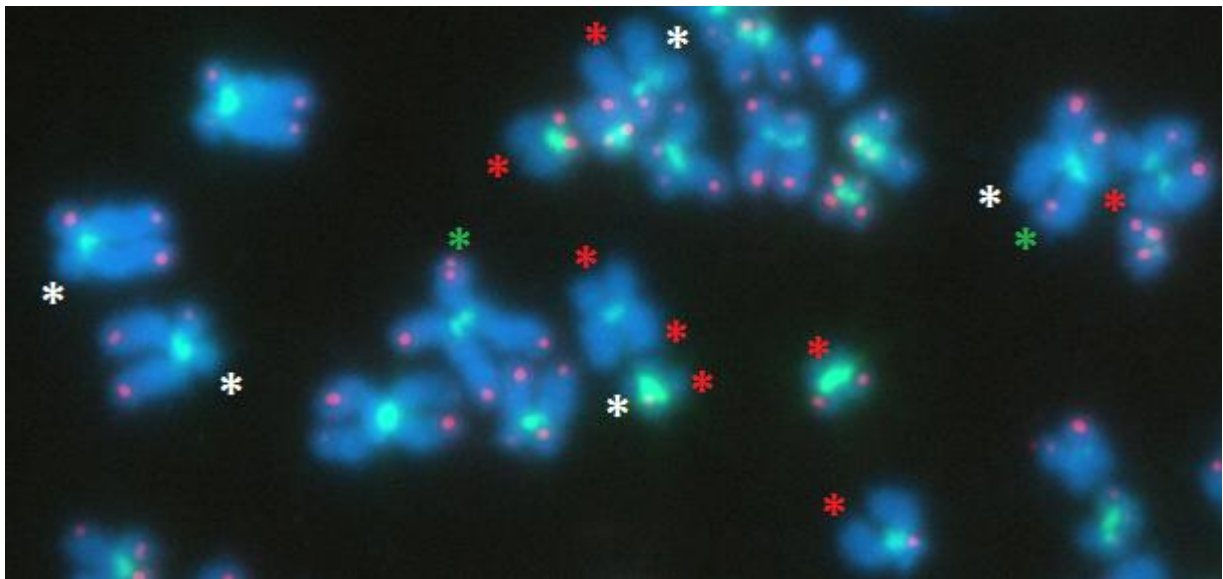
3 Niðurstöður

Telomere FISH var framkvæmt á frumum í metafasa úr FA-D1 frumulínunum Nord og Span og viðmiðunarfrumulínunni EB392. Skoðaðir voru 63 metafasar í Nord, 67 í Span og 58 í EB392. Meðal þeirra galla sem sást í FA-D1 metafösunum voru STL, TFE, MTS, DMTS, ITS, litningar með fleiri en eitt þráðhaft (þar á meðal geislalitningar) og litningabrot á öðrum eða báðum systurlitningsþráðum; með eða án telomere merkja (sjá nákvæmari lýsingu í hluta 2.5 í aðferðakafla og í viðeigandi köflum hér að neðan).

3.1 FA-D1 frumur sýna mikla telomere-galla

3.1.1 Tap á telomere-merkjum (STL og TFE) í FA-D1 frumum

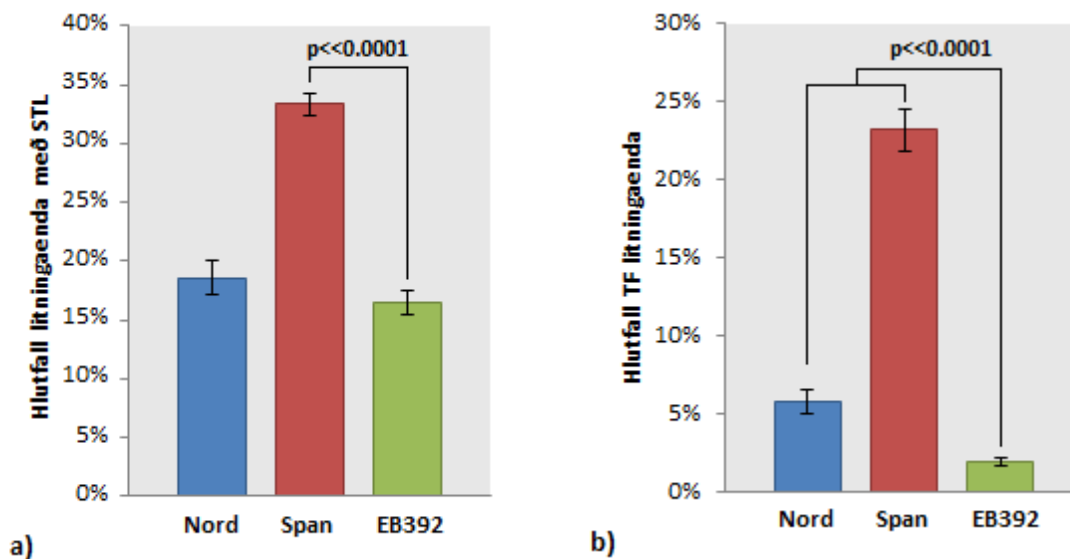
Tap á telomere-merkjum var algengasta gerð telomere-galla sem sást í FA-D1 frumulínunum og var sérstaklega áberandi í Span. Á mynd 3-1 má sjá dæmi um STL og TFE í metafasa úr Nord.



Mynd 3-1 Dæmi um STL og TFE í FA-D1 frumum. FISH mynd úr Nord. Eðlilegur litningur hefur eitt rautt telomere merki á enda hvors systurlitningsþráðar, þ.e. tvö telomere-merki á hverjum litningaenda. Tap á merki annars systurlitningsþráðar er kallað STL (e. single telomere-signal loss) og er merkt með hvítum stjörnum. Tap á telomere-merkjum beggja systurlitningsþráða kallast TFE (e. telomere free end) og er merkt með rauðum stjörnum. Á myndinni eru tveir litningar með ≥ 2 telomere merki á litningaenda annars systurlitningsþráðar sem kallast MTS (e. multiple telomere signal) og er merkt með grænum stjörnum. (Í FISH var notast við Cy3 merktan (raudur) telomere þreifara (CCCTA)_n og FITC merktan þráðhafta þreifara (grænn), litningar voru litaðir með DAPI)

Tap á telomere-merkjum var áberandi algengara í Span en í Nord og viðmiðunarfrumulínunni EB392 (mynd 3-2). Hlutfall litningaenda í Span með STL var að meðaltali 33% og er marktækt hærra en í EB392, 16%, sem og í Nord, 19%, ($p < 0,0001$) (mynd 3-2a). Að sama skapi var hlutfall litningaenda án telomere-merkja (TFE) marktækt hærra í Span, eða að

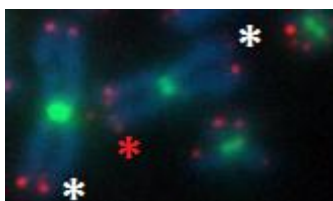
meðaltali 23%, en í hinum frumulínunum tveimur (6% í Nord og 2% í EB392, $p < 0,0001$) (mynd 3-2b). Hlutfall litningaenda með STL var ekki marktækt hærra í Nord en í viðmiðunarfrumulínu en hlutfall TF litningaenda var hins vegar marktækt hærra ($p < 0,0001$).



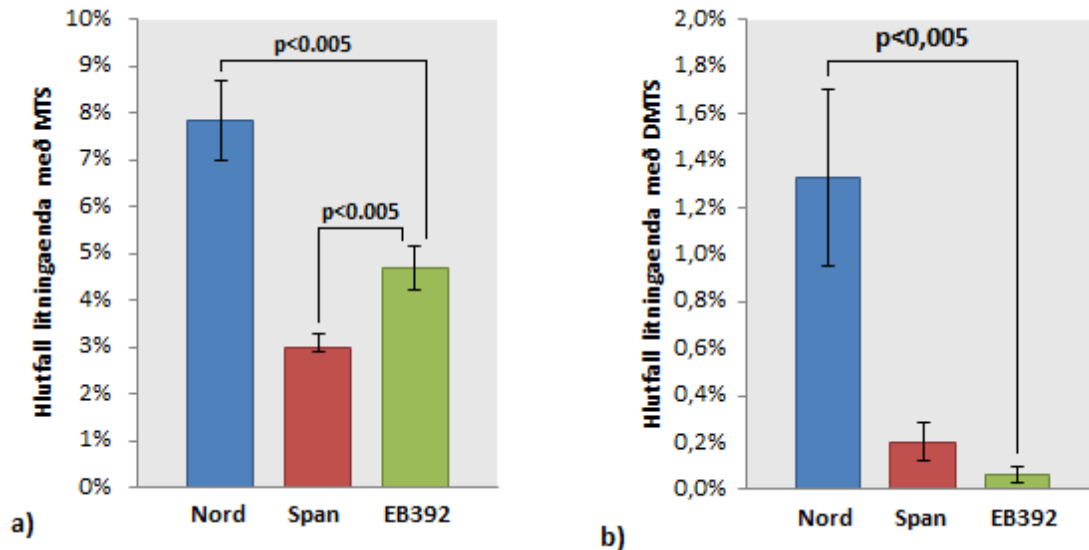
Mynd 3-2 STL og TFE í FA-D1 metafösom. a) Hlutfall litningaenda með STL í metafösom úr FA-D1 frumulínunum Nord og Span og viðmiðunarfrumulínunni EB392. Ekki reyndist marktækur munur á hlutfalli litningaenda með STL í metafösom úr Nord (að meðaltali 19%) og viðmiðunarfrumum (16%), ($p > 0,05$). Span hafði marktækt hærra hlutfall litningaenda með STL (33%) en bæði Nord og viðmiðunarfrumulínan ($p < 0,0001$). b) Hlutfall litningaenda án telomere-merkja (TFE) var að meðaltali marktækt hærra í metafösom úr báðum FA-D1 frumulínum (6% í Nord og 23% í Span) en í viðmiðunarfrumulínu (2%), ($p < 0,0001$). Einnig var hlutfallið marktækt hærra í Span en í Nord. (Öryggismörk: meðaltal \pm staðalskekkja meðaltala, p reiknað út með tvíhliða t -prófi, $\alpha = 0,05$)

3.1.2 MTS og DMTS voru algengari í Nord en í Span

Hlutfall litningaenda með fleiri en eitt telomere-merki á hverjum systurlitningsþræði var ekki eins hátt í FA-D1 frumum og hlutfall litningaenda þar sem orðið hafði tap á telomere-merkjum. Á mynd 3-3 má sjá dæmi um MTS (fleiri en eitt telomere-merki á hverjum systurlitningsþræði) og DMTS (fleiri en eitt telomere-merki á báðum systurlitningsþræðum) í FA-D1 frumum.



Mynd 3-3 Dæmi um MTS og DMTS í FA-D1 frumum. Hluti af FISH mynd af metafasa úr Nord. Litningaendar með MTS eru merktir með hvítri stjörnu og litningaendar með DMTS með rauðri stjörnu.

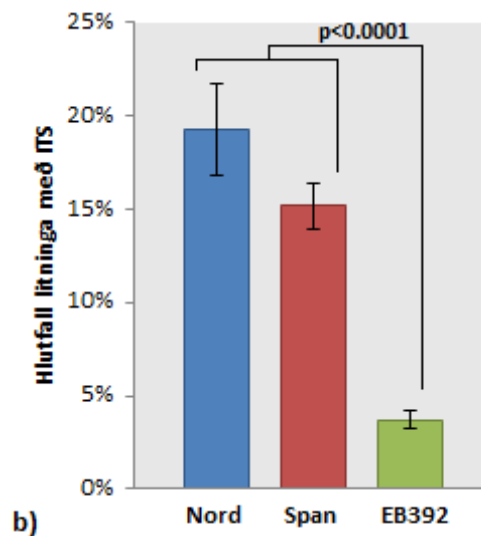
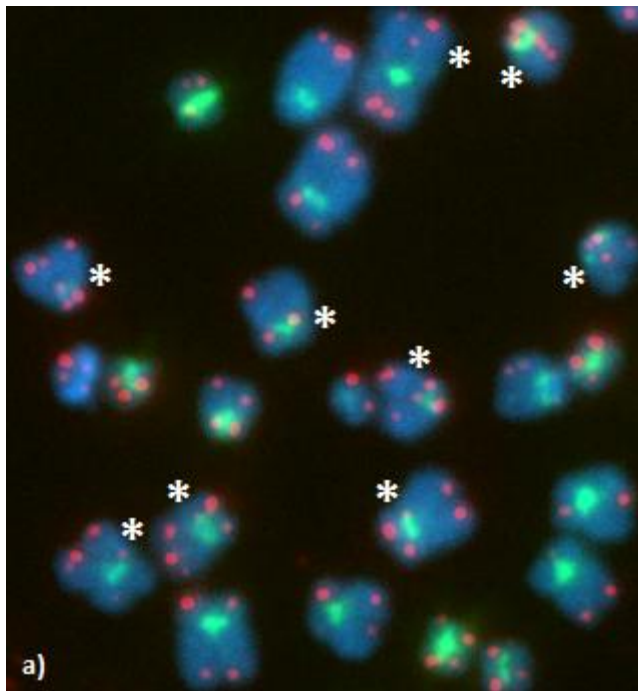


Mynd 3-4 MTS og DMTS í FA-D1 frumum. a) Hlutfall litningaenda með MTS í metafösum úr FA-D1 frumulínunum Nord og Span og í viðmiðunarfrumulínunni EB392. Að meðaltali höfðu 8% litningaenda í Nord MTS en 3% í Span og 5% í viðmiðunarfrumulínu. Hlutfallið í Nord er marktækt hærra en bæði í Span og viðmiðunarfrumulínu ($p < 0,005$). Hlutfallið í Span er marktækt lægra en í viðmiðunarfrumulínu ($p < 0,005$). b) Hlutfall litningaenda með DMTS í metafösum úr FA-D1 frumulínunum Nord og Span og viðmiðunarfrumulínunni EB392. Að meðaltali höfðu 1,3% litningaenda í metafösum úr Nord DMTS sem er marktækt hærra en hlutfallið í bæði Span, 0,2%, og viðmiðunarfrumulínu, 0,1%, ($p < 0,05$). Ekki reyndist vera marktækur munur á hlutfalli litningaenda með DMTS í metafösum úr Span og viðmiðunarfrumulínu.

Öfugt við tap á telomere-merkjum á litningaendum sem var algengt í Span voru litningaendar með mörgum telomere-merkjum áberandi algengari í Nord. Hlutfall þeirra litningaenda sem höfðu MTS (mynd 3-4a) í metafösum úr Nord var að meðaltali 8% og marktækt hærra en bæði í viðmiðunarfrumulínunni EB392, þar sem hlutfallið var 5%, og í Span, þar sem hlutfallið var 3%, ($p < 0,005$). Hlutfall litningaenda með MTS var jafnframt marktækt lægra í metafösum úr Span en í viðmiðunarfrumulínunni. Hlutfall litningaenda með DMTS (mynd 3-4b) var að meðaltali hæst í metafösum úr Nord, eða 1,3%, og marktækt hærra en í bæði Span, 0,2%, og viðmiðunarfrumulínu, 0,1%, ($p < 0,005$). Ekki var marktækur munur á hlutfalli litningaenda með DMTS í Span og viðmiðunarfrumulínunni.

3.1.3 ITS voru algeng í FA-D1 frumum

Telomere-merki innan litninga (ITS), þ.e. ekki á litningaendum, voru nokkuð algeng í báðum FA-D1 frumulínum. Þar sem ITS voru til staðar var oftast aðeins eitt merki á hverjum litningi en þó sáust dæmi um mörg ITS á einum og sama litningnum. Ekki var gerður greinarmunur litningum með eitt ITS og þeim sem höfðu fleiri. Algengt var að telomere-merkin væru við þráðhaft (e. pericentromeric) eða nálægt litningaendanum (e. subtelomeric region) sem gerði greiningu oft á tíðum erfiða (mynd 3-5a).

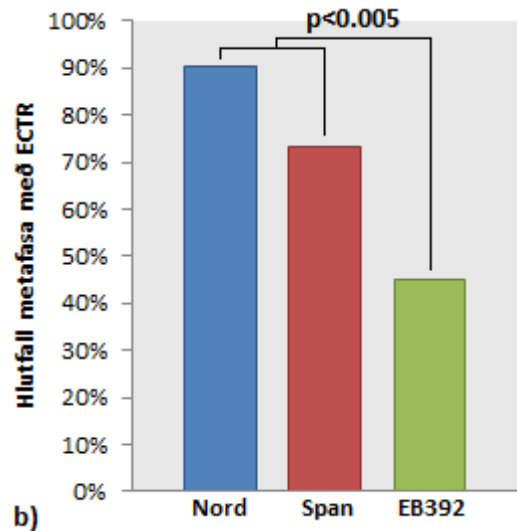
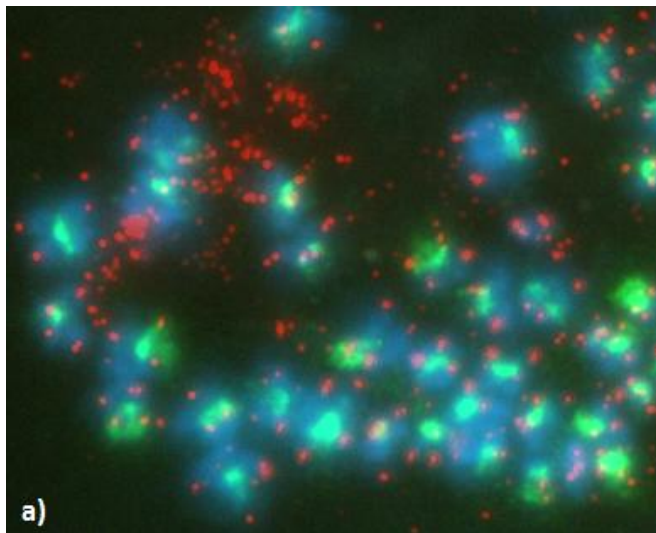


Mynd 3-5 ITS í FA-D1 frumum. a) Á myndinni má sjá hluta af litningum metafasa úr Nord sem hafa marga telomere-galla en sérstaklega óvenjulega mikið af ITS (merkt með hvítum stjörnum). Mjög algengt er að ITS sé staðsett við þráðhaft. b) Hlutfall litninga með ITS í metafösum úr frumulínunum þremur. Metafasar úr FA-D1 frumulínunum höfðu að meðaltali marktækt hærra hlutfall litninga með ITS, 19% í Nord og 15% í Span, en viðmiðunarfrumulínan, 4%, ($p < 0,0001$).

Hlutfall litninga með ITS var marktækt hærra í metafösum úr báðum FA-D1 frumulínunum en í viðmiðunarfrumulínunni ($p < 0,0001$). Hæst var hlutfallið í Nord þar sem að meðaltali 19% litninga höfðu ITS, í Span var hlutfallið 15% en í viðmiðunarfrumulínunni var það 4% (mynd 3-5b).

3.1.4 ECTR voru til staðar í stórum hluta FA-D1 frumna

Við skoðun á FISH myndum af metafösum FA-D1 frumulínanna sáust mjög mörg rauð merki utan litninga, ýmist dreifð um metafasann eða mörg saman í misstórum þyrpingum. Þessi merki eru telomere-raðir utan litninga, ECTR (e. extrachromosomal telomeric repeats) (mynd 3-6a).



Mynd 3-6 ECTR í FA-D1 frumum. a) FISH mynd af metafasa úr Nord með mikið af ECTR, bæði dreifðum um metafásann og í þyrpingu efst til hægri. b) Hlutfall metafasa í frumulínunum þremur þar sem ECTR voru til staðar. Í Nord höfðu 90% metafasa ECTR og 73% í Span. Þetta er í báðum tilfellum marktækt hærra (Nord: $Z=5,37$, $p<0,0001$ og Span: $Z=3,22$, $p<0,005$) en í viðmiðunarfrumulínunni EB392 þar sem 44% metafasa höfðu ECTR. (p reiknað út með tvíhliða Z -prófi, $\alpha=0,05$).

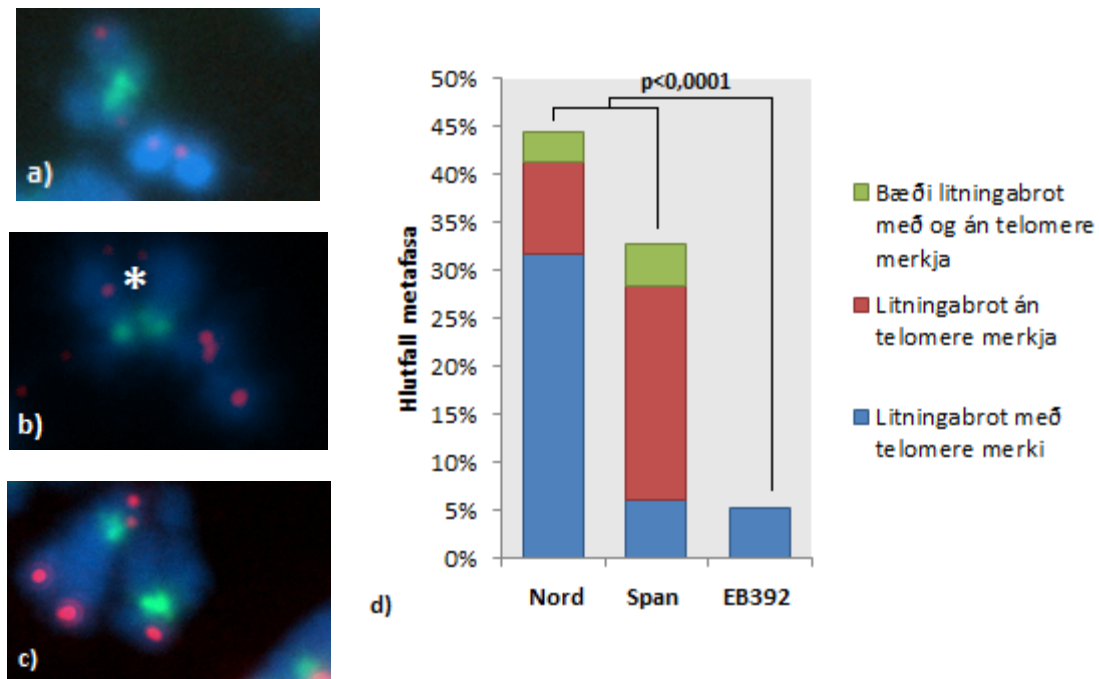
Ekki var gerður greinarmunur á þeim metafösum sem höfðu fáar ECTR og þeim sem höfðu margar. ECTR voru til staðar í stærstum hluta metafasa FA-D1 frumulínanna en sáust í minni mæli viðmiðunarfrumulínunni EB392. 90% metafasa í Nord höfðu ECTR, 73% metafasa í Span og 44% metafasa í EB392 (mynd 3-6b). ECTR voru því til staðar í marktækt hærra hlutfalli metafasa úr FA-D1 frumulínunum en úr EB392 ($p<0,005$). Þó að tölurnar gefi það ekki til kynna var eðlismunur á ECTR í FA-D1 frumulínunum annars vegar og viðmiðunarfrumulínunni hins vegar. Í EB392 voru yfirleitt örfáar ECTR en í FA-D1 frumum voru ECTR yfirleitt miklu fleiri og oft í þyrpingum eins og þeirri sem sést í a) lið á mynd 3-6.

3.2 FA-D1 frumur sýna skýr merki litninga-óstöðugleika

Hlutfall metafasa með litningabrot með eða án telomere-merkja (ekki var gerður greinarmunur á broti á öðrum systurlitningsþræði eða báðum) var athugað og einnig hlutfall metafasa með litninga sem höfðu fleiri en eitt þráðhaft (e. di-or trivalent chromosomes) í FA-D1 frumulínunum. Í öllum tilfellum reyndist hlutfallið vera marktækt hærra í FA-D1 frumum en í viðmiðunarfrumum.

3.2.1 Litningabrot í FA-D1 frumum

Á mynd 3-7 sést samanburður á hlutfalli metafasa með litningabrot hjá FA-D1 frumum og viðmiðunarfrumum auk útskýringamynda.



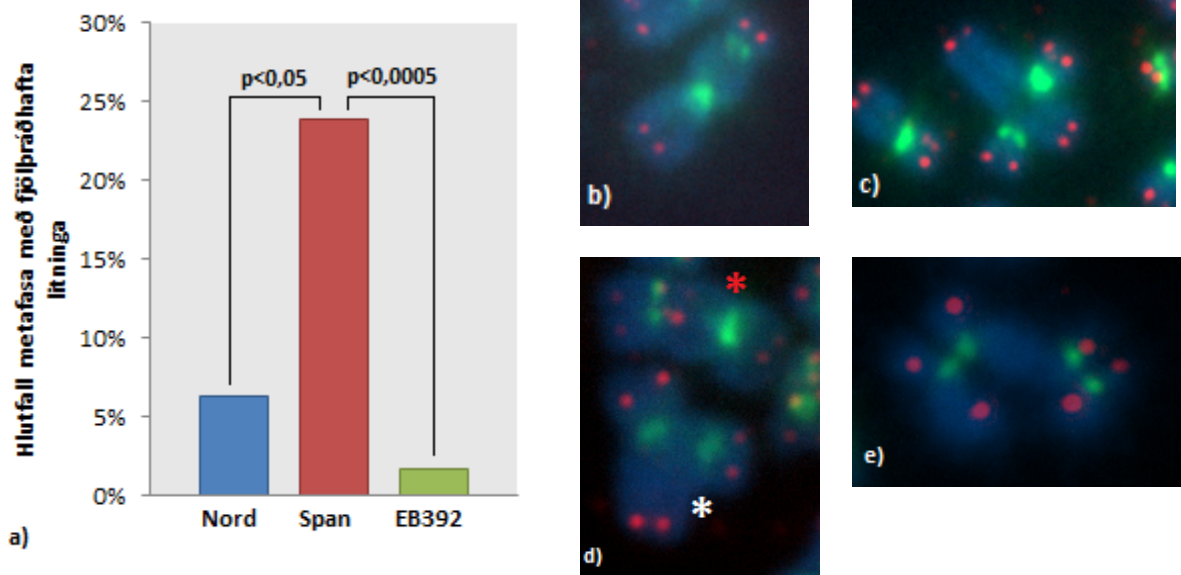
Mynd 3-7 Litningabrot í FA-D1 frumum. *a*) Fullkomið þvíþátta litningabrot með telomere-merkjum á báðum systurlitningsþráðum (úr Nord). *b*) Brot á öðrum systurlitningsþræði með telomere-merki, MTS á hinum systurlitningsþræðinum og hvít stjarna hjá ITS (úr Span). *c*) Fullkomið brot á öðrum systurlitningsþræði án telomere-merkis (úr Nord). *d*) Hlutfall metafasa í frumulínunum þremur með litningabrot með eða án telomere-merkja, ekki var gerður greinarmunur á broti á öðrum systurlitningsþræði eða báðum. Hlutfall metafasa með litningabrotum í Nord var 44% en 33% í Span sem er marktækt hærra en í viðmiðunarfrumum, 5%, (Nord: $z=4,98$, $p < 0,0001$ og Span: $z=3,86$, $p < 0,0001$). Hlutfall metafasa með litningabrot með telomere-merkjum (blátt og grænt á mynd) var marktækt hærra í Nord, 35%, en í Span, 10%, ($z=3,35$, $p < 0,001$). Hlutfall metafasa með litningabrot án telomere-merkja var hins vegar marktækt hærra í Span, 27%, en í Nord, 13%, ($z=2,01$, $p < 0,05$).

Hlutfall metafasa þar sem litningabrot voru til staðar var marktækt hærra í FA-D1 frumum en í viðmiðunarfrumum, þ.e. 44% hjá Nord ($z=4,98$, $p < 0,0001$) og 33% hjá Span ($z=3,86$, $p < 0,0001$) miðað við 5% hjá viðmiðunarfrumulínu (mynd 3.7d). Hlutfall metafasa með litningabrotum með eða án telomere-merkja var þó misjafnt eftir frumulínum. Í viðmiðunarfrumulínunni voru þau litningabrot sem sáust öll með telomere-merkjum. Hlutfall metafasa með litningabrotum án telomere-merkja var marktækt hærra í Span, 27%, en í Nord, 13%, ($z=2,01$, $p < 0,05$) en þessu var öfugt farið með hlutfall metafasa með litningabrot með telomere-merkjum þar sem hlutfallið var marktækt hærra í Nord, 35%, en í Span, 10%, ($z=3,35$, $p < 0,001$). Hlutfall metafasa þar sem litningabrot bæði með og án telomere-merkja voru til staðar var svipað í báðum FA-D1 frumulínum.

3.2.2 Fjölþráðhafta litningar í FA-D1 frumum

Ekki var gerður greinarmunur á þeim fjölþráðhafta litningum sem höfðu telomere-merki á samskeytunum og þeim sem höfðu það ekki. Í Nord var hlutfall metafasa þar sem fjölþráðhafta litningar voru til staðar 6% sem er ekki marktækt hærra en í viðmiðunarfrumum, 2%, ($z=1,28$, $p > 0,05$). Fjölþráðhafta litningar sáust í marktækt hærra hlutfalli metafasa hjá Span, 24%, en í viðmiðunarfrumum ($z=3,60$, $p < 0,0005$) og einnig miðað við Nord ($z=2,50$, $p < 0,05$) og voru þeir gjarnan margir í hverjum metafasa (mynd 3-8a). Á mynd 3-8 b-d má sjá

dæmi um ýmsar gerðir fjölþráðhafta litninga sem sást í FA-D1 frumulínunum, þar á meðal litninga með tveimur eða þremur þráðhöftum, ásamt þrí- og fjórarma geislalitningum.



Mynd 3-8 Fjölþráðhafta litningar í FA-D1 frumum. a) Fjölþráðhafta litningar voru til staðar í 23% metafasa í Span, 6% metafasa í Nord og 2% metafasa í viðmiðunarfrumulínunni EB392. Hlutfall metafasa þar sem fjölþráðhafta litningar voru til staðar var marktækt hærra hjá FA-D1 frumulínunni Span en í viðmiðunarfrumum ($z=3,60$, $p<0,0005$) og einnig marktækt hærra en í Nord ($z=2,50$, $p<0,05$). Hins vegar var munurinn ekki marktækur á milli Nord og viðmiðunarfrumulínunnar ($z=1,28$, $p>0,05$) b) Tvíþráðhafta litningur án telomere-merkja á samskeytum (úr Nord) c) Fjórarma geislalitningur (úr Nord) d) Rauð stjarna er við tvíþráðhafta litning með telomere-merki á samskeytunum en hvít stjarna er við þríarma geislalitning (úr Span). e) Möguleg endatenging litninga (án telomere-merkja) á öðrum litningsþræði (úr Span).

4 Umræður

Í þessari rannsókn voru frumur úr tveimur FA-D1 einstaklingum skoðaðar með tilliti til litninga- og telomere-brenglana með notkun FISH aðferðarinnar. Gallar af þessum toga reyndust algengir í báðum frumulínum en eðli þeirra var þó oft á tíðum mismunandi.

4.1 FA-D1 frumur sýna miklar litninga-og telomera brenplanir

Ýmsar rannsóknir hafa sýnt fram á litningaóstöðugleika og telomere-galla í FA frumum. Mikill litningaóstöðugleiki sem lýsir sér í tíðum litningabrotum og óeðlilegum endurröðunum á milli litninga var eitt af fyrstu einkennum FA frumna sem tekið var eftir (sbr. umfjöllun um litningabrotapróf í kafla 1.1.3). Callen og samstarfsfólk (2002) rannsökuðu svo telomera í FA-A frumum og greindu hærri tíðni litningaenda án telomere-raða, hærri tíðni endatenginga litninga og hærri tíðni af ECTR en í viðmiðunarfrumum.

Fyrri rannsóknir Sigríðar Klöru Böðvarsdóttur og annarra á Rannsóknarstofu í krabbameinsfræðum við læknadeild Háskóla Íslands höfðu sýnt fram á mikinn litningaóstöðugleika og telomere-galla í *BRCA2* stökkbreyttum æxlum og brjóstaþekjufrumulínum úr arfblendnum einstaklingum. Gallar sem voru greindir í þessum rannsóknum voru meðal annars endatengingar litninga (CEFs) með og án telomere-raða á samskeytum, telomere-raðir innan litninga (ITS), telomere-raðir utan litninga (ECTR), tengingar á milli systurlitningsþráða (T-SCEs), tap á telomere-röðum litningaenda (STL og TFE) og fleiri en eitt telomere-merki á litningaenda (MTS). Þessar niðurstöður gáfu til kynna að *BRCA2* gegndi mikilvægu hlutverki við verndun og viðhald telomera (Bodvarsdóttir et al., 2012). Því kom ekki á óvart að flestir þessara galla væru algengir í FA-D1 frumum sem hafa stökkbreytingar í báðum samsætum *BRCA2*. Það sem kom mest á óvart var þó hve mikill munur reyndist á tíðni margra fyrrnefndra galla í frumulínum tveimur.

Tap á telomere-merkjum á endum litninga bendir til galla í eftirmyndun og viðhaldi svo þeir stytast. Til dæmis hefur verið sýnt fram á að svæði nálægt telomerum (e. subtelomeric regions) séu sérstaklega viðkvæm fyrir myndun tvíþátta brota og að afleiðing þess geti verið mikið tap á telomere-röðum í frumum sem ekki geta gert við brotin (Murnane, 2010). Tap á telomere-merkjum (STL og TFE) var áberandi algengt í Span en tíðnin í Nord var svipuð og hjá viðmiðunarfrumulínu (mynd 3-2).

ECTR sáust dreifðar í kring um litninga í stærstum hluta metafasa í frumulínum tveimur sem bendir til þess að telomere-raðir séu að brotna frá litningaendanum. ECTR sáust oft í þyrpingum (líkt og á mynd 3-6a) sem bendir til mögnunar á þeim eftir að þær brotna frá telomeranum. Mögulegt er að ECTR í þessum efnivið séu telomere-hringir, þó liggja engar sannanir fyrir, en slíkir hringir eru einkennandi fyrir ALT frumur (Cesare & Griffith, 2004). Sýnt hefur verið að T-hringir á stærð við t-lykkju geti brotnað frá telomerum við endurröðunarviðgerðir (HR) og að þetta geti verið eitt af þeim atriðum sem stuðli að styttingu telomera (Wang, Smogorzewska, & de Lange, 2004). Hér er HR ferlið þó vanvirkt svo ólíklegt er að þetta eigi við. Önnur skýring er sú að hökt sé í eftirmyndun á telomere-svæðinu (t.d. vegna fyrirferðar G4-quadruplex-a) og þar sem *BRCA2* er ekki til staðar til að vernda eftirmyndunarkvíslina þegar hún stöðvast (Schlachter et al., 2011) myndist óstöðugt ástand og telomere-raðir geti brotnað frá endanum.

Litningaendar með fleiri en einu telomere-merki á öðrum eða báðum systurlitningsþráðum voru áberandi algengir í Nord þar sem hlutfall litninga með MTS og DMTS var marktækt hærra en bæði í Span og viðmiðunarfrumulínu. Hlutfall litningaenda með MTS í Span var raunar marktækt lægra en í viðmiðunarfrumulínu (mynd 3-4). MTS eru talin verða til vegna hökts eða stöðvunar eftirmyndunarkvísarinnar á G-ríka þætti á telomerum sem leiða svo til litningabrot (Nagaraju & Scully, 2007). Í FA-D1 frumum ætti HR ferlið að vera vanvirkt svo ekki er gert við brotin og eftirmyndunarkvíslin fer ekki aftur af stað. Því má líta á MTS sem telomere-raðir sem eru alveg við það að brotna frá litningaendanum. Á endanum leiðir þetta til taps á telomere-röðum af litningaendanum. Athyglisvert er að skoða tíðni MTS samanborið við tap á telomere-merkjum (STL og TFE). Í Span var mikið um tap á telomere-merkjum en lítið um MTS en þessu er öfugt farið hjá Nord. Leiða má líkum að því að í Span séu endar án telomere-raða einfaldlega svo algengir að ekki sé grundvöllur fyrir því að MTS geti myndast á mörgum litningaendum. Þar sem telomere-raðir eru til staðar á litningum eins og í Nord eru MTS hins vegar algeng. Á hluta litningaenda með MTS og DMTS voru telomere-merkin samsíða (sjá mynd 3-3, rauð stjarna). Fyrir þennan undirhóp gæti hafa átt sér stað tvöföldun erfðafnis án skiptingar (e.endoreduplication) sem nýlega hefur verið sýnt fram á að geti orðið vegna telomere-óstöðugleika (Davoli & de Lange, 2012).

Litningabrot voru tíð í báðum frumulínum en þó algengari í Nord en í Span (mynd 3-7). Í samræmi við niðurstöður um tap á telomere-merkjum höfðu meirihluti litningabrot í Nord telomere-merki en stærstur hluti brota í Span var án telomere-merkja. Endatengingar litninga (fjölþráðhafta litningar) og aðrar litningamyndanir svo sem geislalitningar voru til staðar í marktækt hærra hlutfalli metafasa í Span en í Nord og viðmiðunarfrumulínu. Ekki var marktækur munur á fjölda metafasa með fjölþráðhafta litninga á milli Nord og viðmiðunarfrumulínu (sjá mynd 3-8). Vegna erfiðleika við aflestur mynda var ákveðið að taka upplýsingar um litningabrot og fjölþráðhafta litninga saman sem fjölda metafasa þar sem gallarnir voru til staðar (sjá nánar í kafla 4.4). Líklegt er að slík samantekt vanmeti tíðni gallanna, sér í lagi þar sem sami metafasi innhélt oft fleiri en eitt litningabrot eða fjölþráðhafta litning í FA-D1 frumulínunum (sbr. mynd 3-8d og umfjöllun í kafla 4.3). Því má t.d. áætla að munur á hlutfalli metafasa með fjölþráðhafta litninga í Nord og viðmiðunarfrumulínu sé meiri en niðurstöðurnar gefa til kynna.

Litningabrot og fjölþráðhafta litningar geta myndast vegna galla í viðgerðum á tvíþátta brotum í DNA með HR, sem afleiðing af stöðvaðri eftirmyndunarkvís og sem afleiðing BFB ferla (breakage-fusion-breakage cycles). Við frumuskiptingar verða vandræði hjá fjölþráðhafta litningum þegar þráðhöftin eru dregin að sitt hvorum pól frumunnar og litningarnir brotna. Eftir frumuskiptingu geta brotnu litningarnir svo tengst aftur saman. Við endurteknar frumuskiptingar verður til vítahringur litningabrot og litningasamruna (BFB ferli) sem getur gefið af sér hinar ýmsu útgáfur af samtengdum litningum, litningabrotum og öðrum litningabrenglum (Murnane, 2010). Í þessari rannsókn var ekki gerður greinarmunur á þeim fjölþráðhafta litningum sem höfðu telomere-merki á samskeytunum og þeim sem höfðu þau ekki en almennt eru endatengingar litninga vísbending um galla í verndun telomera (e. telomeric capping defect).

ITS voru til staðar í marktækt hærra hlutfalli litninga í FA-D1 frumulínunum tveimur miðað við viðmiðunarfrumulínu (mynd 3-5b). Telomere raðir innan litninga er m.a. hægt að útskýra með ófullnægjandi viðgerðum á tvíþátta brotum í DNA ásamt göllum í verndun telomera. Ef verndun telomera er ekki í lagi brotna telomere-raðir auðveldlega frá endum litninganna, þessar ECTR raðir er svo hægt að innlima í litningabrotið til að gera við það (Bolzan & Bianchi, 2006). Algengt var að sjá ITS við þráðhöft eða nálægt telomerum sem er í samræmi við rannsóknir sem hafa sýnt að litningabrot í ALT frumulínum eiga sér gjarnan stað

nálægt þráðhöftum (Gagos et al., 2008) og að svæði nálægt telomerum séu brotagjörn (Murnane, 2010).

4.2 Umræða um FA-D1 frumulínur

Eins og rakið hefur verið hér að framan var munur á milli FA-D1 frumulínanna Nord og Span mikill en engin augljós ástæða er fyrir þessu. FA er mjög fjölbreytilegur sjúkdómur hvað svipgerðir varðar eins og rætt var í kafla 1.2.1 í inngangi og á þetta bæði við klínísk sjúkdómseinkenni og svipgerðareinkenni frumna. FA-D1 undirgerðin er talin vera sú alvarlegasta en er ekki frekar en hinar undanskilin innri breytileika í svipgerðum. Erfðabreytileiki er þó aðeins talinn útskýra hluta þessa mikla breytileika í svipgerðum.

Mismunandi stökkbreytingar í *BRAC2* liggja að baki hvorri FA-D1 frumulínu, eða 886delGT og 8447T->G í Nord en 1825delA og úrfelling á útröðum 15 og 16 í Span. Samkvæmt The Universal Mutation Database valda allar þessar stökkbreytingar stöðvun umritunar fyrr en það á að gerast svo að próteinafurðin er ekki heil (nánar í kafla 2.1). Burt séð frá því hvaða áhrif þessar stökkbreytingar hafa á BRCA2 próteinið og virkni þess ætti það ekki að skipta máli þar sem próteinið kæmist aldrei inn í kjarnann sem er grundvallaratriði fyrir virkni þess. Ástæðan er sú að tvö NLS er að finna á síðustu 156 aminósýrum C-enda BRCA2 (Spain et al., 1999) og allar ofantaldar stökkbreytingar eru það snemma í geninu að þetta svæði próteinsins er ekki myndað. Ef aðeins þessi rök væru tekin til greina ætti því enginn munur að vera á frumulínunum en svo er ekki tilfellið.

Báðar frumulínurnar sem hér voru notaðar voru úr óbirtum tilfellum af FA-D1 og upplýsingar um klínísk svipgerðareinkenni einstaklinganna voru ekki fyrir hendi. Í samantekt Alter og félaga frá 2007 á 27 FA-D1 tilfellum sést að 886delGT er algeng stökkbreyting hjá FA-D1 einstaklingum. Hún hefur raunar verið tengd við aukna áhættu á að fá heilaæxli (Reid et al., 2005) þó erfitt sé að staðfesta það vegna lítils fjölda sjúklinga.

Tvö FA-D1 tilfelli hafa verið birt sem hafa stökkbreytingar í *BRCA2* á sömu stöðum og Nord, þ.e. 886delGT og 8447T->A (ath. að í Nord er 8447T->G) (Hirsch et al., 2004). Í báðum tilfellum myndast stopptákni (L2740X). Á meðal klínískra svipgerðareinkenna hjá þessum einstaklingum voru café-au-leit flekkir, smátt höfuð og hjartagallar en það sem var sérstakt var að sjúklingarnir höfðu ekki merki um beinþurrð eða hvítblæði heldur komu föst æxli (heilaæxli og Wilm's æxli) fram mjög snemma á lífsleiðinni. Greiningar á litningum þessara tveggja einstaklinga sýndu óvenju miklar sjálfsprottnar litningabrenglanir, ólíkt því sem sést í frumum annarra FA undirgerða. Meðal þeirra litningagalla sem sáust í hárrí títöni voru litningabrot og samruni litninga en litningabrot sáust einmitt í mjög háu hlutfalli metafasa úr Nord (mynd 3-7d). Áhugavert væri að bera klíníska svipgerð einstaklingsins sem Nord frumulínan kemur úr við ofangreind tilfelli.

4.3 Mikill breytileiki var á metafösom innan hvorrar FA-D1 frumulínu

Í niðurstöðukafla að ofan eru upplýsingar um tíðni galla í hverri frumulínu teknar saman sem hlutfall þeirra litningaenda eða litninga að meðaltali í hverjum metafasa sem höfðu viðkomandi galla. Þessi meðaltöl segja þó ekki alla söguna þar sem dreifing gildanna var í mörgum tilfellum mjög mikil eins og sést á því að öryggismörk eru oft á tíðum víð (sjá mynd 3-4b sem dæmi). Í báðum FA-D1 frumulínum var áberandi að metafasararnir voru ekki einsleitir hvað varðaði gerð galla eða tíðni þeirra. Í Nord var sérstaklega áberandi að sumir metafasar voru nánast eðlilegir á meðan aðrir höfðu gríðarlega mikið af bæði litninga- og telomere-göllum. Þetta er áhugaverð staðreynd í samhengi við umræðu um mósak í

eitilfrumum hluta FA sjúklinga. Slík mósafk veldur því að hluti eitilfrumna hefur starfhæf BRCA2 prótein og þá líklega ekki eins mikinn litningaóstöðugleika (Lo Ten Foe et al., 1997).

Þar að auki voru þeir metafasar sem höfðu litninga-og telomere-galla mjög margbreytilegir. Í mörgum metafösum virtist einhver ákveðin gerð galla vera algengust, þ.e. í sumum var tap á telomere-merkjum algengast og nánast á hverjum litningi en í öðrum metafösum var ekkert um tap heldur höfðu MTS eða ITS yfirhöndina. Sama má segja um fjölþráðhafta litninga í FA-D1 metafösunum. Niðurstöðurnar voru teknar saman sem hlutfall metafasa sem þar sem fjölþráðhafta litningar voru til staðar og tilhneigingin var að ef þeir voru til staðar þá voru þeir margir.

4.4 Hugleiðingar og hugsanlegt áframhald

Út frá niðurstöðum þessarar rannsóknar er ljóst að litningaóstöðugleiki er mikill og telomere-gallar tíðir í þeim tveimur FA-D1 frumulínum sem skoðaðar voru. Munur á eðli gallanna í FA-D1 frumulínunum tveimur var þó svo mikill að erfitt er að alhæfa almennt um litninga-og telomere brenglanir í FA-D1 frumum. Til þess væri nauðsynlegt að gera sams konar rannsókn og hér var gerð á frumum úr mun fleiri FA-D1 einstaklingum.

Eins og áður sagði voru báðar frumulínurnar sem hér voru notaðar úr óbirtum tilfellum af FA-D1 og upplýsingar um svipgerðareinkenni einstaklinganna voru ekki fyrir hendi. Það væri óneitanlega áhugavert að fá þessar upplýsingar til að bera saman niðurstöður á rannsóknnum á frumum og klíníska svipgerð og verður það líklega gert ef frekar verður unnið með niðurstöður rannsóknarinnar í framtíðinni.

Frumulínan Span reyndist einstaklega erfið í ræktun og við skoðun á metafösum í flúrsmásjá eftir FISH virkuðu litningarnir tættir (óreglulegir) sem torveldaði aflestur mynda. Telomere-merki og þráðhöft voru nokkuð skýr svo að niðurstöður um telomere-galla eru áreiðanlegar en erfiðara var að meta hvort litningar væru raunverulega samtengdir eða ekki út frá DAPI litun. Af þessum ástæðum voru litningabrot og fjölþráðhafta litningar ekki taldir í hverjum metafasa fyrir sig heldur voru metafasar flokkaðir eftir því hvort þeir höfðu slíka galla eða ekki. Litningabrot og fjölþráðhafta litningar voru tíðir í Span (myndir 3-7d og 3-8a). Ef einhver vafi lék á því hvort litningar væru samtengdir eða brotnir voru þeir skráðir eðlilegir svo að þessi atriði eru líklega vanmetin ef eitthvað er.

Til viðbótar við þá telomere-galla sem voru skoðaðir í þessari rannsókn væri áhugavert að skoða millivíxl litningaenda á systurlitningsþráðum, T-SCEs (telomere sister chromatid exchanges), með því að nota CO-FISH aðferðina. Rannsóknir hafa sýnt að tíðni T-SCEs eykst í *BRCA2* stökkbreyttum frumum (Bodvarsdóttir et al., 2012; Sapir et al., 2011) svo áhugavert væri að skoða þetta í þessum efnivið. Í báðum FA-D1 frumulínunum, Span og Nord, voru missterk telomere-merki algeng en T-SCEs geta valdið missterkum telomere-merkjum á systurlitningsþráðum. Þetta mætti staðfesta með CO-FISH.

Að lokum er áhugavert að bera niðurstöður þessarar rannsóknar saman við niðurstöður rannsóknar Sigríðar Klöru Böðvarsdóttur sem hún er óbeint framhald af. Í þeirri rannsókn voru skoðaðir margir sömu þættir og hér í *BRCA2* stökkbreyttum æxlum og brjóstaþekjufrumulínum úr arfberum. Um 40% metafasa í arfberum höfðu einn eða fleiri fjölþráðhafta litning og þar af höfðu 10% telomere-raðir á samskeytunum. Hlutfallið var svipað í *BRCA2* stökbreyttu æxlissýnunum. ITS voru til staðar á 15-20% litninga í arfblendnum frumum, hlutfall litningaenda með STL í hverjum metafasa var 20-30% en 5-10% með TFE (Bodvarsdóttir et al., 2012). Í þessari rannsókn hafði lægra hlutfall metafasa fjölþráðhafta litninga, eða 24% í Span og 6% í Nord, en eins og áður sagði gætu þessar tölur verið vanmetnar. Hér voru telomere-raðir á samskeytum fjölþráðhafta litninga ekki skoðaðar. Hlutfall litninga í hverjum metafasa sem höfðu ITS var nánast það sama, eða 19% í Nord og

15% í Span. Að lokum var hlutfall litningaenda í hverjum metafasa með STL og TFE hærra í Span, eða 33% og 23%, en sambærilegt í Nord, eða 19% og 6%. Hafa ber í huga að skekkja vegna aflestrar mynda getur verið töluverð á milli einstaklinga og að mismunandi frumgerðir voru notaðar við rannsóknirnar, brjóstaþekjufrumur annars vegar og eitilfrumur hins vegar.

Hörður Bjarnason vinnur nú að því að klára meistaraverkefni sitt sem var unnið á Rannóknarstofu í krabbameinsfræðum við læknadeild Háskóla Íslands. Í því verkefni gerði hann m.a. telomere-FISH greiningar á metafasa-litningum úr eitilfrumum einstaklinga sem eru arfblendnir m.t.t. stökkbreytinga í *BRCA2*. Einnig voru sams konar greiningar gerðar á eitilfrumum FA-D1 einstaklings sem var enn einkennalaus um þrítugt. Hann hafði sömu stökkbreytinguna aftarlega í báðum samsætum *BRCA2* gensins. Þegar niðurstöður Harðar liggja fyrir væri áhugavert að bera þær saman við þær niðurstöður sem fengust í þessari rannsókn. Með þeim samanburði væri hægt að fá frekari vísbendingar um mismunandi áhrif þess á litninga-og telomere stöðugleika að hafa eina virka *BRCA2* samsætu eða enga.

Heimildir

- Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R. M., Lingner, J., & Terns, M. P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol Cell Biol*, 30(12), 2971-2982.
- Alter, B. P., & Kupfer, G. (2002, uppfært 7. febrúar 2013). Fanconi Anemia. *GeneReviews* [Internet]. Sótt 25.apríl, 2013: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/>
- Alter, B. P., Rosenberg, P. S., & Brody, L. C. (2007). Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/BRCA2. *J Med Genet*, 44(1), 1-9.
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O. P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D. G., & Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72(5), 1117-1130.
- Auerbach, A. D. (2003). Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 8, Unit 8 7.
- Auerbach, A. D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res*, 668(1-2), 4-10.
- Badie, S., Escandell, J. M., Bouwman, P., Carlos, A. R., Thanasoula, M., Gallardo, M. M., Suram, A., Jaco, I., Benitez, J., Herbig, U., Blasco, M. A., Jonkers, J., & Tarsounas, M. (2010). BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. *Nat Struct Mol Biol*, 17(12), 1461-1469.
- Bodvarsdóttir, S. K., Steinarsdóttir, M., Bjarnason, H., & Eyfjord, J. E. (2012). Dysfunctional telomeres in human BRCA2 mutated breast tumors and cell lines. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 729(1-2), 90-99.
- Bolzan, A. D., & Bianchi, M. S. (2006). Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 612(3), 189-214.
- Cesare, A. J., & Griffith, J. D. (2004). Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol*, 24(22), 9948-9957.
- Chandra, S., Levrán, O., Jurickova, I., Maas, C., Kapur, R., Schindler, D., Henry, R., Milton, K., Batish, S. D., Cancelas, J. A., Hanenberg, H., Auerbach, A. D., & Williams, D. A. (2005). A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol Ther*, 12(5), 976-984.

- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., & Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, *426*(6963), 194-198.
- D'Andrea, A. D. (2013). BRCA1: A Missing Link in the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Cancer Discov*, *3*(4), 376-378.
- Davoli, T., & de Lange, T. (2012). Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell*, *21*(6), 765-776.
- de Lange, T. (2005a). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, *19*(18), 2100-2110.
- de Lange, T. (2005b). Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *70*, 197-204.
- Domchek, S. M., Tang, J., Stopfer, J., Lilli, D. R., Hamel, N., Tischkowitz, M., Monteiro, A. N., Messick, T. E., Powers, J., Yonker, A., Couch, F. J., Goldgar, D. E., Davidson, H. R., Nathanson, K. L., Foulkes, W. D., & Greenberg, R. A. (2013). Biallelic Deleterious BRCA1 Mutations in a Woman with Early-Onset Ovarian Cancer. *Cancer Discov*, *3*(4), 399-405.
- Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., & Reddel, R. R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*, *26*(4), 447-450.
- Esashi, F., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H., & West, S. C. (2007). Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat Struct Mol Biol*, *14*(6), 468-474.
- Fanconi, G. (1927). Familiäre infantile perniziosartige anämie (pernizioses blutbild und konstitution). *Jahrb. Kinderh*, *117*, 257-280.
- Fackenthal, J. D., & Olopade, O. I. (2007). Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. [Review]. *Nat Rev Cancer*, *7*(12), 937-948.
- Gagos, S., Chiourea, M., Christodoulidou, A., Apostolou, E., Raftopoulou, C., Deustch, S., Jefford, C. E., Iminger-Finger, I., Shay, J. W., & Antonarakis, S. E. (2008). Pericentromeric instability and spontaneous emergence of human neocentric and minute chromosomes in the alternative pathway of telomere lengthening. *Cancer Res*, *68*(19), 8146-8155.
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, *43*(2 Pt 1), 405-413.
- Gretarsdottir, S., Thorlacius, S., Valgardsdottir, R., Gudlaugsdottir, S., Sigurdsson, S., Steinarsdottir, M., Jonasson, J. G., Anamthawat-Jonsson, K., & Eyfjord, J. E. (1998). BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res*, *58*(5), 859-862.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, *97*(4), 503-514.
- Guervilly, J. H., Mace-Aime, G., & Rosselli, F. (2008). Loss of CHK1 function impedes DNA damage-induced FANCD2 monoubiquitination but normalizes the abnormal G2 arrest in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet*, *17*(5), 679-689.

- Hirsch, B., Shimamura, A., Moreau, L., Baldinger, S., Hag-alshiekh, M., Bostrom, B., Sencer, S., & D'Andrea, A. D. (2004). Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood. *Blood*, *103*(7), 2554-2559.
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Ikeda, H., Fox, E. A., & D'Andrea, A. D. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, *297*(5581), 606-609.
- Kee, Y., & D'Andrea, A. D. (2012). Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *J Clin Invest*, *122*(11), 3799-3806.
- King, T. A., Li, W., Brogi, E., Yee, C. J., Gemignani, M. L., Olvera, N., Levine, D. A., Norton, L., Robson, M. E., Offit, K., Borgen, P. I., & Boyd, J. (2007). Heterogenic loss of the wild-type BRCA allele in human breast tumorigenesis. *Ann Surg Oncol*, *14*(9), 2510-2518.
- Knies, K., Schuster, B., Ameziane, N., Rooimans, M., Bettecken, T., de Winter, J., & Schindler, D. (2012). Genotyping of fanconi anemia patients by whole exome sequencing: advantages and challenges. *PLoS One*, *7*(12), e52648.
- Levy M.Z., Allsopp R.C., Futcher A.B., Greider C.W., & Harley C.B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*, *225*, 951-960.
- Lo Ten Foe, J. R., Kwee, M. L., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Veerman, A. J., van Weel, M., Pauli, R. M., Shahidi, N. T., Dokal, I., Roberts, I., Altay, C., Gluckman, E., Gibson, R. A., Mathew, C. G., Arwert, F., & Joenje, H. (1997). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet*, *5*(3), 137-148.
- Martinez, P., & Blasco, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*, *11*(3), 161-176.
- Michel, B., Flores, M. J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M., & Bidnenko, V. (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(15), 8181-8188.
- Moynahan, M. E., & Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(3), 196-207.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., & Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(18), 6622-6626.
- Murnane, J. P. (2010). Telomere loss as a mechanism for chromosome instability in human cancer. *Cancer Res*, *70*(11), 4255-4259.
- Nagaraju, G., & Scully, R. (2007). Minding the gap: the underground functions of BRCA1 and BRCA2 at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)*, *6*(7), 1018-1031.
- NCBI (2013). BRCA2 breast cancer 2, early onset [*Homo sapiens* (human)]. *National Center of Biotechnology Information*, sótt 25. apríl 2013: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/675>
- Noll, D. M., Mason, T. M., & Miller, P. S. (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev*, *106*(2), 277-301.

- Oostra, A. B., Nieuwint, A. W., Joenje, H., & de Winter, J. P. (2012). Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*, 2012, 238731.
- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 42, 301-334.
- Patel, K. J., Yu, V. P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Colledge, W. H., Friedman L. S., Ponder, B. A., & Venkitaraman, A. R. (1998). Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell*, 1(3), 347-357.
- Reid, S., Renwick, A., Seal, S., Baskcomb, L., Barfoot, R., Jayatilake, H., Pritchard-Jones, K., Stratton, M. R., Ridolfi-Lüthy, A., & Rahman, N. (2005). Biallelic BRCA2 mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour. *J Med Genet*, 42(2), 147-151.
- Sapir, E., Gozaly-Chianea, Y., Al-Wahiby, S., Ravindran, S., Yasaei, H., & Slijepcevic, P. (2011). Effects of BRCA2 deficiency on telomere recombination in non-ALT and ALT cells. *Genome Integr*, 2, 9.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., & Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*, 145(4), 529-542.
- Schlacher, K., Wu, H., & Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*, 22(1), 106-116.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S. T., Hockemeyer, D., MacRae, S. L., Karlseder, J., Schildkraut, C. L., & de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell*, 138(1), 90-103.
- Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., & Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, 386(6627), 804-810.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), 867-874
- Shimamura, A., & Alter, B. P. (2010). Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*, 24(3), 101-122.
- Soulier, J. (2011). Fanconi anemia. [Review]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 492-497.
- Spain, B. H., Larson, C. J., Shihabuddin, L. S., Gage, F. H., & Verma, I. M. (1999). Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 13920-13925.
- Stansel, R. M., de Lange, T., & Griffith, J. D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J*, 20(19), 5532-5540.
- Takai, H., Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol*, 13(17), 1549-1556.

- Thorlacius, S., Olafsdottir, G., Tryggvadottir, L., Neuhausen, S., Jonasson, J. G., Tavgigian, S. V., Tulinius, H., Ogmundsdottir, H. M., & Eyfjord, J. E. (1996). A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet*, *13*(1), 117-119.
- Thorslund, T., & West, S. C. (2007). BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene*, *26*(56), 7720-7730.
- Tischkowitz, M. D., & Hodgson, S. V. (2003). Fanconi anaemia. *Journal of Medical Genetics*, *40*(1), 1-10.
- UniProt Consortium (2013). P51587 (BRCA2_HUMAN). *UniProtKB Protein Knowledgebase*, sótt 9. maí 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/P51587>
- Verdun, R. E., & Karlseder, J. (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell*, *127*(4), 709-720.
- Wang, R. C., Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2004). Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*, *119*(3), 355-368.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2008). *Molecular biology of the gene* (6th ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Pearson/Benjamin Cummings ;Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavgigian, S. V., & Bartel, P. L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem*, *272*(51), 31941-31944.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, *18*(2), 173-179.
- Wu, P., van Overbeek, M., Rooney, S., & de Lange, T. (2010). Apollo contributes to G overhang maintenance and protects leading-end telomeres. *Mol Cell*, *39*(4), 606-617.
- Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H., & Pavletich, N. P. (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, *297*(5588), 1837-1848.
- Yu, V. P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L. A., van Gool, A. J., West, S. C., & Venkitaraman, A. R. (2000). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev*, *14*(11), 1400-1406.