

Ewelina Antoszevska

Analiza molekularna kompleksu
genów *MRE11/RAD50/NBS1*
w rodzinach z agregacją
zachorowań na raki piersi i/lub jajnika

(rozprawa doktorska)

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik i promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

Gdańsk 2014

Praca została sfinansowana z grantu naukowego nr N 401 164 31/3656

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki	5
1.2. Substancje chemiczne i roztwory	5
1.3. Symbole aminokwasów	6
1.4. Geny i białka	7
1.5. Pozostałe skrót	8
2. STRESZCZENIE	9
2.1. <i>Abstract</i>	10
3. WSTĘP	11
3.1. Podłoże genetyczne choroby nowotworowej	11
3.2. Raki piersi i jajnika	12
3.2.1. Rak piersi	12
3.2.1.1. Rak piersi u mężczyzn	12
3.2.2. Rak jajnika	13
3.3. Podstawy dziedziczenia nowotworów	13
3.3.1. Podłoże genetyczne raka piersi i jajnika	13
3.3.2. <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> – geny o wysokiej penetracji	15
3.3.2.1. Struktura genów <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> oraz ich produktów białkowych	15
3.3.2.2. Funkcje białek <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	16
3.3.2.3. Spektrum mutacji w genach <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	17
3.3.3. Inne geny związane z agregacją zachorowań na raki piersi i/lub jajnika w rodzinie	17
3.3.3.1. Geny o wysokiej penetracji: <i>TP53</i> , <i>PTEN</i>	17
3.3.3.2. Geny o umiarkowanej i niskiej penetracji	18
3.3.3.2.1. Geny <i>BRIP1</i> , <i>BARD1</i> , <i>CHEK2</i> i <i>PALB2</i>	18
3.3.3.3. Geny <i>MRE11</i> , <i>RAD50</i> i <i>NBS1</i> kodujące białka kompleksu MRN	20
3.3.3.4. Funkcje kompleksu MRN kodowanego przez geny <i>MRE11</i> , <i>RAD50</i> i <i>NBS1</i>	22
3.3.3.4.1. Naprawa DNA	22
3.3.3.4.2. Rola kompleksu MRN w procesie naprawy DSBs	22
3.3.3.5. Mutacje w genach <i>MRE11</i> , <i>RAD50</i> i <i>NBS1</i>	25
4. CEL	27
5. MATERIAŁ I METODY	28
5.1. Materiał	28
5.1.1. Kryteria rodowodowe	28
5.1.2. Charakterystyka badanych kobiet	28
5.1.3. Aparatura	29
5.1.4. Odczynniki	30
5.1.5. Roztwory	31
5.2. Metody	31
5.2.1. Izolacja limfocytów z krwi obwodowej	31
5.2.2. Izolacja RNA z limfocytów	32
5.2.2.1. Synteza cDNA	32
5.2.3. Amplifikacja fragmentów DNA techniką PCR	32
5.2.4. Wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (DHPLC)	33
5.2.5. Sekwencjonowanie wybranych produktów reakcji PCR	37
5.2.6. Analiza cDNA	37
5.2.7. Amplifikacja fragmentów techniką ASA-PCR	39
5.2.8. Narzędzia <i>in silico</i>	41
5.2.9. Nazewnictwo mutacji genów <i>MRE11</i> , <i>RAD50</i> i <i>NBS1</i>	41
5.2.10. Analiza statystyczna	41

6. WYNIKI	42
6.1. Analiza molekularna genu <i>MRE11</i>	42
6.2. Warianty sekwencyjne wykryte w genie <i>RAD50</i>	45
6.3. Spektrum mutacji w genie <i>NBS1</i> w grupie 109 pacjentek z dziedzicznym rakiem piersi	50
7. DYSKUSJA	55
7.1. Mutacje w genie <i>NBS1</i> są związane z podatnością na nowotwory piersi i/lub jajnika	55
7.2. Zmiany w genie <i>RAD50</i> obserwowane u pacjentów z rakiem piersi i/lub jajnika	58
7.3. Udział mutacji genu <i>MRE11</i> w dziedzicznej predyspozycji do rozwoju raka piersi i/lub jajnika	61
7.4. Podsumowanie	62
8. WNIOSKI	63
9. PIŚMIENNICTWO	64

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki

Å	angstrom, 10^{-10} m
g	gram
kDa	kilodalton, jednostka masy
l	litr, dm^3
m	mol
M	stężenie molowe, mol/dm^3
min	minuta
sek	sekunda
U	jednostka enzymu
k	kilo, 10^3
m	mili, 10^{-3}
µ	mikro, 10^{-6}
n	nano, 10^{-9}

1.2. Substancje chemiczne i roztwory

A	adenina
APS	nadsiarczan amonu (<i>ammonium persulphate</i>)
C	cytozyna
ddH ₂ O	podwójnie destylowana woda
dNTPs	dezoksyrybonukleotydy (adeninowy, guaninowy, tyminowy i cytozynowy)
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
G	guanina
KHCO ₃	wodorowęglan potasu
MgCl ₂	chlorek magnezu
NaCl	chlorek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
NH ₄ Cl	chlorek amonu
RBC	bufor do lizy erytrocytów (<i>red blood cell lysis buffer</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
T	tymina
TAE	bufor do elektroforezy z kwasem octowym (<i>Tris – Acetate – EDTA</i>)
TBE	bufor do elektroforezy z kwasem bornym (<i>Tris – Borate – EDTA</i>)
TEMED	N,N,N,N' – tetrametyloetylenodiamina
TRIS	2 – amino – hydroksymetylo – 1,3 – propanodiol

1.3. Symbole aminokwasów

A (Ala)	Alanina
C (Cys)	Cysteina
D (Asp)	Kwas asparaginowy
E (Glu)	Kwas glutaminowy
F (Phe)	Feniloalanina
G (Gly)	Glicyna
H (His)	Histydyna
I (Ile)	Izoleucyna
K (Lys)	Lizyna
L (Leu)	Leucyna
M (Met)	Metionina
N (Asn)	Aspargina
P (Pro)	Prolina
Q (Gln)	Glutamina
R (Arg)	Arginina
S (Ser)	Seryna
T (Thr)	Treonina
V (Val)	Walina
W (Trp)	Tryptofan
Y (Tyr)	Tyrozyna

1.4. Geny i białka

APC	gen podatności na rodzinną polipowatość jelita grubego (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
ATM	gen kodujący kinazę białkową serynowo-treoninową, zmutowaną w zespole ataksji-teleangiektazji (<i>ataxia telangiectasia mutated</i>)
ATR	gen kodujący kinazę białkową z rodziny PI3/PI4, zmutowaną w zespole ataksji-teleangiektazji (<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>)
BACH1 (BRIP1)	gen kodujący helikazę RNA zależną od ATP (<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>)
BARD1	gen kodujący białko oddziałujące z domeną RING BRCA1 (<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>)
BRCA1	gen podatności na raka piersi 1 (<i>breast cancer susceptibility gene 1; breast cancer 1, early onset</i>)
BRCA2	gen podatności na raka piersi 2 (<i>breast cancer susceptibility gene; breast cancer 2, early onset</i>)
BCR/ABL	gen fuzyjny (<i>breakpoint cluster region – Abelson murine leukemia</i>) powstały w wyniku translokacji chromosomów t(9;22))
CHK2	gen kodujący kinazę białkową serynowo-treoninową, zaangażowaną w proces naprawy DNA (<i>CHK2 checkpoint homolog</i>)
MLH1	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2, (E.coli)</i>)
MLH2	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>mutL homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 2, (E.coli)</i>)
MRE11	gen kodujący białko o aktywności egzonukleazy i endonukleazy (<i>MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i>)
MSH6	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>mutS (E.coli) homolog 6</i>)
NBS1/NBN	gen kodujący nibrynę (p95) (<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>)
NF1	gen nerwiakowłóknowości typu 1 (<i>neurofibromatosis type 1</i>)
PALB2	gen kodujący białko oddziałujące z BRCA2 (<i>partner and localizer of BRCA2</i>)
PTEN	gen kodujący homolog fosfatazy i tensyny (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)
RAD50	gen kodujący homolog białka bakteryjnego RecA (<i>RAD50 homolog (S.cerevisiae)</i>)
RB1	gen siatkówczaka złośliwego (<i>retinoblastoma</i>)
TP53	gen kodujący białko TP53 (<i>tumor protein 53</i>)

1.5. Pozostałe skróty

ASA PCR	amplifikacja specyficzna w stosunku do allelu (<i>allele – specific amplification polymerase chain reaction</i>)
BASC	kompleks białkowy związany z białkiem BRCA1 (<i>BRCA1 associated genome surveillance complex</i>)
BIC	baza: <i>Breast Cancer Information Core</i> , http://research.nhgri.nih.gov/bic/
BRCT	domena występująca głównie w białkach zaangażowanych w naprawę DNA (<i>BRCA1 carboxyterminal domain</i>)
CIMBA	organizacja zajmująca się badaniem genów podatności na raka piersi i/lub jajnika (<i>The Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2</i>)
DHPLC	dentauracyjna wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>denaturing high performance liquid chromatography</i>)
DSBs	pęknięcia podwójnej nici DNA (<i>double strand breaks</i>)
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in-situ</i> (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
FHA	domena znajdująca się w wielu białkach o funkcjach regulatorowych (<i>forkhead-associated domain</i>)
HA	analiza heterodupleksów (<i>heteroduplex analysis</i>)
HBOCs	dziedziczny rak piersi/jajnika (<i>hereditary breast/ovarian cancer</i>)
HRT	hormonalna terapia zastępcza (<i>hormonal replacement therapy</i>)
LFL	zespół podobny do zespołu Li-Fraumeni (<i>Li-Fraumeni like syndrome</i>)
LFS	zespół Li-Fraumeni (<i>Li-Fraumeni syndrome</i>)
MLPA	zależna od ligazy reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)
NHEJ	niehomologiczne łączenie końców (<i>nonhomologous end-joining</i>)
NLS	sygnał lokalizacji jądrowej (<i>nuclear localization signal</i>)
NMD	proces polegający na rozpoznawaniu i niszczeniu transkryptów zawierających przedwczesny kodon STOP (<i>nonsense - mediated mRNA decay</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
pz	par zasad
RING	domena występująca głównie u białek biorących udział w procesie ubikwitynizacji (<i>really interesting new gene domain</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organization</i>)

2. STRESZCZENIE

5–10% zachorowań na raki piersi i jajnika spowodowanych jest uwarunkowaniami genetycznymi. Głównymi genami, których mutacje zwiększają ryzyko wystąpienia tych nowotworów są *BRCAl* i *BRCA2*, jednakże wraz z genami *PTEN*, *TP53*, *ATM* i *STK11* obejmują zaledwie 25-28% podłoża dziedzicznego raka piersi i jajnika. Uważa się, że za znaczną część zachorowań odpowiadają mutacje w genach o niskiej penetracji.

Celem rozprawy było określenie częstości występowania wariantów sekwencyjnych w obrębie całych sekwencji kodujących genów *MRE11*, *RAD50* oraz *NBS1* w grupie wyselekcjonowanych pacjentek chorych na rodzinne raki piersi i/lub jajnika. Analizę mutacji przeprowadzono z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz bezpośredniego sekwencjonowania. Badania wykonano w grupie 109 kobiet pochodzących z rodzin silnie obciążonych zachorowaniami na nowotwory piersi i/lub jajnika będących pod opieką onkologicznej poradni genetycznej w Wojewódzkim Centrum Onkologii w Gdańsku w latach 1999-2007.

Analiza molekularna genu *MRE11* doprowadziła do wykrycia 11 zmian sekwencyjnych. Jedną spośród dwóch zmian eksonowych była potencjalnie patogenna (p.Ala452Asp), jednakże jej biologiczne znaczenie nie zostało określone. Pozostałe zmiany stanowiły znane polimorfizmy tego genu.

W genie *NBS1* znaleziono 15 zmian sekwencyjnych, spośród których siedem zlokalizowanych było w częściach kodujących genu. Zidentyfikowano nową, potencjalnie patogenną substytucję: p.Arg169His zachodzącą w obrębie domeny BRCT. U dwóch pacjentek zidentyfikowano znane patogenne mutacje: c.657_661del oraz p.Ile171Val. Pozostałe warianty sklasyfikowano jako neutralne polimorfizmy.

Wykryto siedem zmian sekwencyjnych genu *RAD50*, spośród których trzy nie były dotąd opisane. W obrębie eksonów zidentyfikowano dwa warianty, pozostałych pięć zaobserwowano w intronach. Jedną ze zmian eksonowych jest nowa i na podstawie wyników analiz *in silico* została sklasyfikowana jako potencjalnie patogenna (p.Pro250Leu). Zidentyfikowano dwie nowe zmiany intronowe genu *RAD50*, które wystąpiły w sekwencjach konsensus: c.756+5C>T, c.1052-2A>C. Zmiany zostały poddane analizom prowadzonym na poziomie cDNA oceniającym ich wpływ na proces *splicingu*. Pomimo iż nie potwierdzono udziału tych wariantów w procesie wycinania intronów, ich wpływ na białko nie został wykluczony. Pozostałe warianty stanowiły częste i uznawane za neutralne polimorfizmy.

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają, że heterozygotyczne warianty sekwencyjne genów kompleksu MRN mogą być odpowiedzialne jedynie za niewielką liczbę zachorowań na dziedziczne nowotwory piersi i/lub jajnika w Polsce. Dodatkowo wskazują, że patogenne mutacje genów kompleksu MRN nie wpływają znacząco na wzrost ryzyka zachorowania na raka piersi i/lub jajnika. Jednakże do pełnego wyjaśnienia ich udziału w rozwoju nowotworów niezbędne będą badania prowadzone na różnych populacjach i w dużych grupach badanych kobiet z rakiem piersi i/lub jajnika.

2.1. Abstract

Approximately 5-10% of all breast and ovarian cancer cases are estimated to result from a hereditary predisposition to the disease. *BRCA1* and *BRCA2* are major genes which mutations predispose to breast and ovarian cancer. Alongside with mutations in other susceptibility genes such as *PTEN*, *TP53*, *ATM* and *STK11* they explain no more than 25-28% of these familial cases. Therefore additional genes are likely to be discovered.

The aim of this study was to evaluate prevalence and spectrum of *MRE11*, *RAD50* and *NBS1* germline mutations in breast cancer families. Altogether 109 Polish patients having breast and/or ovarian cancer were analysed. Mutations were searched for by DHPLC and sequencing technique. The samples were collected at Regional Oncological Outpatient Clinic in Gdańsk from patients diagnosed with familial breast and/or ovarian cancer between 1999 and 2007.

Mutation analysis of the *MRE11* gene revealed 11 alterations, two of which were located in the protein-encoding region. One of them was considered as possibly harmful for protein function (p.Ala452Asp). All the other alterations were classified as harmless polymorphisms.

15 alterations were observed in the *NBS1* gene. Seven of them were in the protein-encoding region. Among them one was previously unidentified and, as it appeared in the BRCT domain, was considered a possible pathogenic alteration (p.Arg169His). Two cancer-associated mutations were detected, c.657_661del and p.Ile171Val. The other alterations were considered to be harmless polymorphisms.

Examination of *RAD50* revealed seven alterations, three of which were previously unidentified. Two genomic variants were located in the protein-coding region. One of exonic substitutions was new and based on the results of *in silico* analysis was considered as putative pathogenic alteration (p.Pro250Leu). Two intronic alterations were observed: c.756+5C>T, c.1052-2A>C. To evaluate their impact on splicing process they were analysed on the cDNA level. The results were inconclusive as no disturbed transcript was detected. Their role in the splicing process can not be excluded. The other alterations were classified as neutral polymorphisms.

Overall, the results indicate that heterozygous MRN complex variants may contribute only to a limited fraction of familial breast and/or ovarian cancers in Poland. Altogether these results suggest that pathogenic mutations in these genes are rare and carry no, or a very small, increased risk of cancer. To confirm their role in tumorigenesis extended analysis among larger groups of patients and controls is necessary.

3. WSTĘP

3.1. Podłoże genetyczne choroby nowotworowej

Rak jest chorobą genetyczną komórki powstałą w wyniku wieloletniego nagromadzenia się mutacji genowych prowadzących do zmian w jej biologii polegających na zaburzeniu regulacji procesów proliferacji, apoptozy i różnicowania się komórki oraz na utracie zdolności do samonaprawy uszkodzonego DNA. Komórki z nagromadzonymi mutacjami ulegają selekcji formując dominujący klon, który ostatecznie tworzy guz nowotworowy. Na tym etapie komórki wykazują zdolność do inwazyjnego wzrostu oraz tworzenia odległych przerzutów (Limon, 2006).

Rozwój guza nowotworowego związany jest z zaburzeniem działania mechanizmów kontrolujących podział komórkowy i utrzymujących stabilność genomową komórki. Przekształcenie się komórki prawidłowej w komórkę nowotworową wymaga zajścia kilku mutacji. Uważa się, że nowotwory wywodzące się z tkanki nabłonkowej, takie jak raki piersi, jelita grubego i prostaty, wynikają z zajścia około 5-7 mutacji, podczas gdy nowotwory wywodzące się z komórek krwiotwórczych wymagają znacznie więcej zmian w ich genomie (Stratton i in, 2009).

Onkogeneza jest procesem wieloetapowym i składa się z trzech podstawowych faz: inicjacji, promocji i progresji. Inicjację procesu nowotworowego rozpoczyna pojawienie się w komórce pierwszej mutacji. Dochodzi do akumulacji kolejnych zmian, zarówno spontanicznych, jak i będących następstwem poprzednich. W fazie promocji komórka wyraźnie zwiększa aktywność mitotyczną, jednocześnie dochodzi do nagromadzenia się nowych zmian w coraz większej liczbie genów. Na tym etapie występuje zjawisko mikroewolucji komórkowej, podczas której wyodrębniony zostaje dominujący klon komórkowy tworzący ostatecznie guz nowotworowy. Ostatnim etapem procesu nowotworzenia jest progresja. Powstające naczynia wydzielają czynniki wzrostu stymulując dalszy wzrost guza. Komórki dominującego klonu akumulują coraz więcej mutacji oraz nabierają zdolności do swobodnej migracji do innych narządów organizmu. Skutkuje to naciekaniem sąsiadujących tkanek oraz tworzeniem odległych przerzutów (Hanahan i Weinberg, 2000; Siedlecki, 2006).

Nowotwory klasyfikuje się w zależności od ich charakteru jako łagodne lub złośliwe. Główne typy nowotworów złośliwych można podzielić na raki, czyli guzy wywodzące się z tkanki nabłonkowej, mięsaki (pochodzące z tkanki łącznej), chłoniaki i białaczki (z tkanki limfoidalnej) oraz czerniaki pochodzące z melanocytów skóry.

Do prawidłowego wzrostu komórki potrzebny jest zbalansowany udział genów, które można zaklasyfikować w trzech głównych grupach: protoonkogeny, geny supresorowe oraz geny odpowiedzialne za utrzymanie stabilności genomu (mutatorowe). Zaburzenie proporcji ich sygnałów stymuluje procesy prowadzące do transformacji nowotworowej.

Prawidłowa funkcja protoonkogenów polega na regulowaniu wzrostu komórki. Mutacje w obrębie protoonkogeny powodują przekształcenie się tego genu w onkogen promujący wzrost komórki nawet przy braku czynników wzrostu. Mutacja w jednym allelu jest wystarczająca do rozpoczęcia niekontrolowanego wzrostu komórki. Do powstania onkogeny prowadzą zarówno translokacje, jak w przypadku genu fuzyjnego *BCR/ABL* stwierdzanego w przewlekłej białaczce szpikowej (PBSz), jak również mutacje punktowe, czego przykładem są zmiany w obrębie genu *HRAS* i *KIT*, identyfikowane również w PBSz.

Rolą genów supresorowych jest negatywna regulacja cyklu komórkowego. Kodowane przez nie białka są często zaangażowane w aktywację punktów kontrolnych, indukcję apoptozy oraz interakcje pomiędzy białkami. Produkty białkowe genów supresorowych rozpoznają uszkodzenia DNA, zatrzymują podział uszkodzonej komórki umożliwiając ich naprawę lub, w przypadku poważnych uszkodzeń, kierują ją na drogę apoptozy. Utrata funkcji dwóch kopii genu supresorowego wiąże się z wejściem komórki w stan niekontrolowanej proliferacji (Knudson, 1971). Najlepiej poznanymi genami supresorowymi są: *RBI*, *TP53*, *NF1*, *NF2*, *CDKN2A* i *APC*.

Produkty białkowe genów ochraniających integralność genomu biorą udział w naprawie uszkodzeń DNA zapobiegając powstawaniu niestabilności chromosomowej. Do tej grupy zaliczane są geny MMR (ang. *mismatch repair*), takie jak: *hMLH1*, *hMLH2* i *hMLH6*, odpowiedzialne za naprawę

błędnie wstawionych zasad, oraz geny opiekuńcze (ang. *caretakers*) do których zaliczamy *BRC1* i *BRC2* (Siedlecki, 2006).

3.2. Raki piersi i jajnika

3.2.1. Rak piersi

W 2012 r. w Europie zarejestrowano 3,5 mln zachorowań na nowotwory złośliwe. Spośród nich ok. 15% stanowiły raki piersi zajmując pierwszą pozycję w zachorowalności na nowotwory złośliwe i trzecią pod względem zgonów nowotworowych (Ferlay i in., 2013). Obserwuje się kilkakrotne różnice w częstości zachorowań na raka piersi wśród kobiet na świecie, wynikające z odmiennych społeczno-ekonomicznych warunków istniejących w danych częściach świata (Bray i in., 2004). Najwyższy odsetek zachorowań występuje w krajach wysokorozwiniętych, w których ryzyko wystąpienia raka piersi przed 80 r. ż. wynosi 10% (Feuer i in., 1993). Odnotowane w 2010 r. standaryzowane współczynniki zachorowalności i umieralności na ten nowotwór w Polsce wynoszą odpowiednio 49,6 i 13,7 (www.onkologia.org.pl - dane z 2010 r.).

Najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju raka piersi jest jego rodzinne występowanie. Istotny wpływ mają również czynniki środowiskowe związane z długotrwałą ekspozycją na działanie estrogenów jak wczesny wiek pierwszej miesiączki, późny pierwszej ciąży, krótki okres karmienia piersią, bezdzietność i późny początek menopauzy (Pike i in., 2004).

Rak piersi jest nowotworem o najwyższej umieralności w Polsce, odpowiedzialnym za ponad pięć tysięcy zgonów w roku 2010 (www.onkologia.org.pl). Przyczyną złych wyników leczenia jest znaczne zaawansowanie kliniczne choroby w momencie diagnozy. Poprawę sytuacji wiąże się z wprowadzeniem bardziej efektywnych programów profilaktyki i wczesnej diagnostyki jak np. bezpłatnej mammografii w ramach programu przesiewowego dla kobiet w wieku od 50 do 69 lat. W państwach, w których wdrożony został ten program, obserwuje się znaczny spadek umieralności na raka piersi (*International Agency for Research on Cancer: Breast Cancer Screening*. Lyon: IARC Press; 2002).

Raki piersi można podzielić na nienaciekające oraz naciekające. Pośród raków nienaciekających wyróżniane są raki przewodowe oraz zrazikowe. Raki naciekające dzielone są na przewodowe oraz zrazikowe (WHO, ang. *World Health Organization*). Występowanie receptorów estrogenowych i progesteronowych dodatkowo różnicuje guzy piersi na receptorowo dodatnie (ER+/; PR+/) lub ujemne (ER-/; PR-/). Odsetek odpowiedzi na leczenie hormonalne jest ściśle związany z obecnością receptorów ER i PR w raku piersi. Odpowiednia kwalifikacja chorych do określonego fenotypu raka, przeprowadzona na podstawie oceny profilu ekspresji tych receptotów, pozwala na przewidzenie skuteczności leczenia hormonalnego (Perou i in., 2000).

3.2.1.1. Rak piersi u mężczyzn

Rak piersi stanowi mniej niż 1% wszystkich nowotworów diagnozowanych u mężczyzn (Jemal i in., 2004). Ryzyko wystąpienia tego nowotworu zwiększa się wraz z wiekiem. Średni wiek zachorowania u mężczyzn jest pięć lat wyższy niż u kobiet i przypada na 67 r. ż. (Giordano i in., 2004). Najważniejszym czynnikiem ryzyka jest nosicielstwo mutacji w genie *BRC2*. W tym przypadku życiowe ryzyko wystąpienia nowotworu piersi wynosi średnio 10% i jest około 90 razy wyższe od ryzyka w populacji ogólnej (Couch i in., 1996; Thompson i Easton, 2001). Częstość zmian identyfikowanych w genie *BRC2* wśród mężczyzn chorych na raka piersi waha się od 4 do 40% w różnych populacjach. Najwyższy odsetek mutacji występuje w populacji fińskiej i wynika z obecności w tym kraju mutacji założycielskiej genu *BRC2*: c.771_775del (999del5) (Friedman i in., 1997; Thorlacius i in., 1996). Do pozostałych czynników ryzyka należą zaburzenia hormonalne związane z nieprawidłowym poziomem estrogenów i testosteronu. Z tego względu u 3-7% pacjentów z rakiem piersi diagnozowany jest zespół Klinefeltera, w którym ryzyko wystąpienia tego raka jest 50-krotnie wyższe niż w populacji ogólnej (Hultborn i in., 1997). Agregacja zachorowań na raka piersi w rodzinie zwiększa ryzyko wystąpienia tego nowotworu u mężczyzny nawet 2,5-krotnie. Wśród najważniejszych czynników środowiskowych wymienia się nadmierną ekspozycję na działanie

promieniowania rentgenowskiego oraz spożywanie alkoholu (Rosenblatt i in., 1991; Weiss i in., 2005).

3.2.2. Rak jajnika

Rak jajnika jest szóstym co do częstości nowotworem wśród kobiet na świecie (Ferlay i in., 2010). Najwyższe ryzyko wystąpienia tego nowotworu zaobserwowano w krajach wysokorozwiniętych, głównie w północnej i zachodniej Europie oraz północnej Ameryce i wynosi ono ok. 2% (Lukanova i Kaaks, 2005). W grupie najwyższego ryzyka znajdują się nosicielki mutacji *BRCA1* i *BRCA2*. Obserwuje się odpowiednio 40% i 10% ryzyko zachorowania do 70 r. ż. (Antonioni i in., 2003). Nowotwory jajnika dzieli się na trzy grupy w zależności od komórek, z których się wywodzą. Największą grupę stanowią nowotwory pochodzenia nabłonkowego, od 4-6% zajmują nowotwory wywodzące się ze sznurów płciowych i zrębu jajnika oraz około 20% wszystkich raków jajnika zajmują nowotwory wywodzące się z komórek rozrodczych (Prat, 2012). Wyniki najnowszych badań wskazują, że rak jajnika może wywodzić się z komórek pochodzących z jajowodów (Kurman, 2013; Perets i in., 2013).

Wśród dobrze poznanych czynników zwiększających ryzyko choroby zalicza się agregację zachorowań na raka piersi i/lub jajnika w rodzinie, wczesny wiek pierwszej miesiączki i bezdzietność. Zmniejszenie ryzyka wystąpienia raka jajnika związane jest z ponad 5-letnim przyjmowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych, jak również z ciążą i karmieniem piersią (Brynhildsen, 2014; Riman i in., 2002; Whittemore i in., 1992).

Rak jajnika jest główną przyczyną zgonów wśród pacjentek z nowotworami ginekologicznymi. Okres pięcioletniego przeżycia pacjentek ze zdiagnozowanym I stadium choroby wynosi 70%, z kolei w stadium IV tylko 5%. Trudności we wczesnym rozpoznaniu choroby powodują, że 75% kobiet, u których diagnozuje się ten nowotwór, znajduje się w III i IV stadium zaawansowania nowotworu (Oberaigner i in., 2012).

3.3. Podstawy dziedziczenia nowotworów

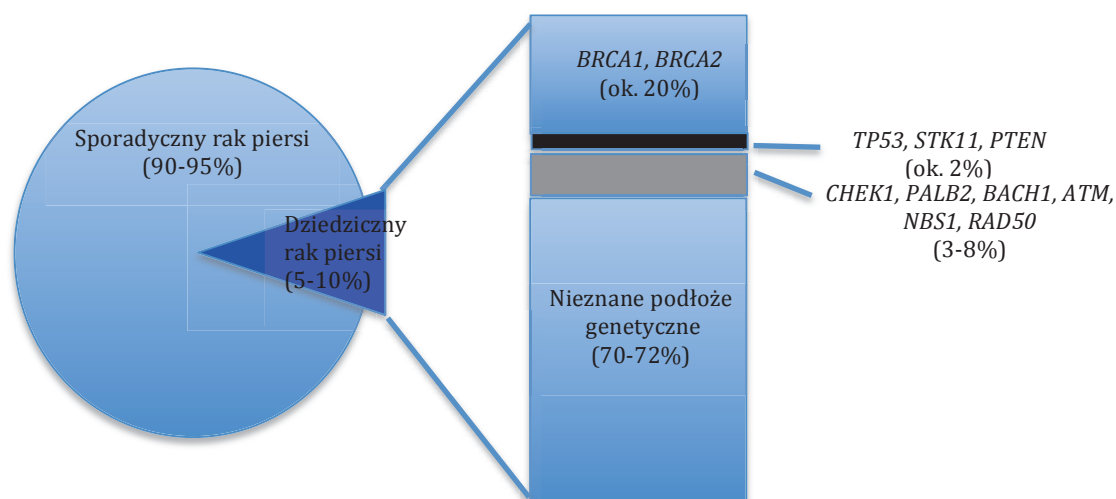
Zjawisko dziedziczenia skłonności do powstawania nowotworów zostało zaobserwowane już ponad 100 lat temu. W celu poznania podstaw tej predyspozycji prowadzono badania wśród rodzin, u których występowały liczne zachorowania na ten sam rodzaj nowotworu.

Tylko 5-10% wszystkich nowotworów powstaje w wyniku odziedziczenia mutacji germinalnych. Do najlepiej poznanych zespołów dziedzicznych należą: rodzinny rak piersi typu 1 i 2 związany z mutacjami w genach *BRCA1* i *BRCA2*, wrodzony niepolipowaty rak jelita grubego – zespoły Lynch I i II (mutacje w genach *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*), zespół von Hippel-Lindau'a (gen *VHL*), polipowatość rodzinna (gen *APC*) i zespół Li-Fraumeni z mutacją w genie *TP53* (Fishel i in., 1993; Fostira i in., 2007; Li i Fraumeni, 1969; Miki i in., 1994; Wooster i in., 1995). Mechanizm rozwoju najczęstszych nowotworów dziedzicznych określa teoria Knudsona, zgodnie z którą do inicjacji procesu nowotworowego dochodzi po zajściu mutacji w obu allelach genu supresorowego. Zatem ryzyko rozwoju nowotworu w przypadku obecnej mutacji germinalnej jest 1000 razy wyższe niż powstanie dwóch mutacji *de novo* w tym samym miejscu w parze alleli danego genu (Knudson, 1971).

3.3.1. Podłoże genetyczne raka piersi i jajnika

Większość przypadków zachorowań na raki piersi i jajnika określanych jest jako sporadyczne. Tylko 5-10% spośród wszystkich zachorowań powstaje w wyniku odziedziczenia mutacji germinalnej (Claus i in., 1996; Narod i Foulkes, 2004). Charakterystyczne cechy genetycznej predyspozycji do nowotworów piersi i/lub jajnika to wczesny wiek zachorowania (przed 40 r. ż.), występowanie w rodzinie dwóch lub więcej przypadków zachorowań na raka piersi, jak również przypadek obustronnego raka piersi, raka jajnika lub raka piersi u mężczyzny w rodzinie (Easton i in., 1993; Thull i Vogel, 2004). Rodzinne występowanie raków piersi i/lub jajnika jest cechą niektórych zespołów dziedzicznych, w których za predyspozycję do rozwoju tych nowotworów

odpowiadają mutacje w genach o wysokiej penetracji: *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, oraz o penetracji umiarkowanej: *STK11*. Zmiany w tych genach tłumaczą podłoże genetyczne około 25% zachorowań o typie dziedzicznym. W tabeli 1 przedstawiono wybrane zespoły, w których występuje rodzinna agregacja zachorowań na nowotwory piersi i/lub jajnika. Około 3-8% zachorowań wynika z mutacji w genach takich jak np.: *CHEK2*, *PALB2*, *BACH1*, *ATM*, *NBS1* i *RAD50* (Maxwell i Nathanson, 2013). Procentowy udział mutacji w poznanych genach w ogólnej liczbie zachorowań na dziedziczne raki piersi i/lub jajnika przedstawiono poniżej (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat przedstawiający procentowy udział mutacji w poznanych genach w rozwoju dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika.

Tab. 1. Wybrane zespoły dziedziczne, w których występuje agregacja zachorowań na nowotwory, w tym raki piersi i/lub jajnika.

Gen/locus	Zespół	Penetracja mutacji	Ryzyko raka piersi	Charakterystyczne nowotwory	Źródło
<i>BRCA1</i> (17q)	Rodzinny rak piersi typu 1	Wysoka	przed 70 r.ż.: 65%	Raki piersi, jajnika, jelita grubego, prostaty	(Antoniou i in., 2003)
<i>BRCA2</i> (13q)	Rodzinny rak piersi typu 2	Wysoka	przed 70 r.ż.: 45%	Raki piersi, jajnika, jelita grubego, trzustki, rak piersi u mężczyzn	(Antoniou i in., 2003)
<i>ATM</i> (11q)	Ataksja-teleangiektazja (AT)	Umiarkowana	przed 70 r.ż.: 23%	Białaczki w wieku dziecięcym, raki piersi u dorosłych pacjentów	(Thompson i in., 2005)
<i>PTEN</i> (10q)	Choroba Cowdena	Wysoka/umiarkowana	Życiowe ryzyko 25-50%	Raki piersi, endometrium, tarczycy	(Sabate i in., 2006)
<i>TP53</i> (17p)	Zespół Li-Fraumeni (LFS, <i>Li-Fraumeni syndrome</i>)	Wysoka	przed 45 r.ż.: 50-60%; Życiowe ryzyko 100%	Raki piersi, mózgu, trzustki, białaczki, mięsaki	(Easton i in., 1993)
<i>STK11</i> (19p)	Zespół Peutz-Jeghersa	Umiarkowana	przed 64 r.ż.: 54%	Raki żołądka, jelita grubego, trzustki, piersi, płuc, grasicy	(Giardiello i in., 2000; Lim i in., 2003)

U około 20% pacjentów z rodzinną agregacją nowotworów piersi i/lub jajnika wykrywane są mutacje w genach wysokiej penetracji *BRCA1* lub *BRCA2*. Nosicielstwo mutacji w tych genach wiąże się z podwyższonym ryzykiem raka piersi i wynosi odpowiednio 65% i 45% oraz raka jajnika (odp. 39% i 11%) (Antoniou i in., 2003; Oldenburg i in., 2007).

3.3.2. *BRCA1* i *BRCA2* – geny o wysokiej penetracji

3.3.2.1. Budowa genów *BRCA1* i *BRCA2* oraz ich produktów białkowych

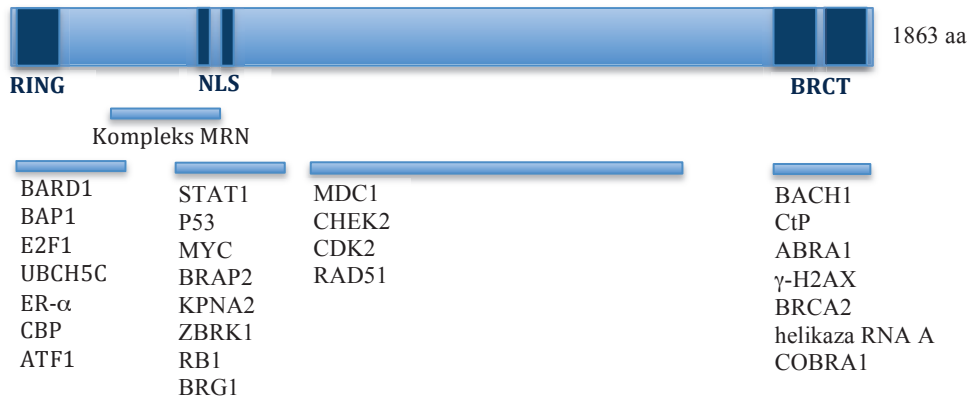
Gen *BRCA1* zbudowany jest z 24 eksonów, z których 22 stanowią sekwencje kodujące (80kb). Zlokalizowany jest w długich ramionach chromosomu 17 (17q21.1) (Hall i in., 1990). Transkrypt genu *BRCA1* o długości 7,8 kb koduje białko o masie molekularnej 220 kDa zbudowane z 1863 reszt aminokwasowych (Smith i in., 1996).

Gen *BRCA2* składa się z 27 eksonów, z których 26 koduje białko złożone z 3418 aminokwasów o masie 384 kDa. Zlokalizowany jest w długich ramionach chromosomu 13 (13q12.3). Długość tego genu wynosi około 82 kb, a jego transkryptu - 11,2 kb.

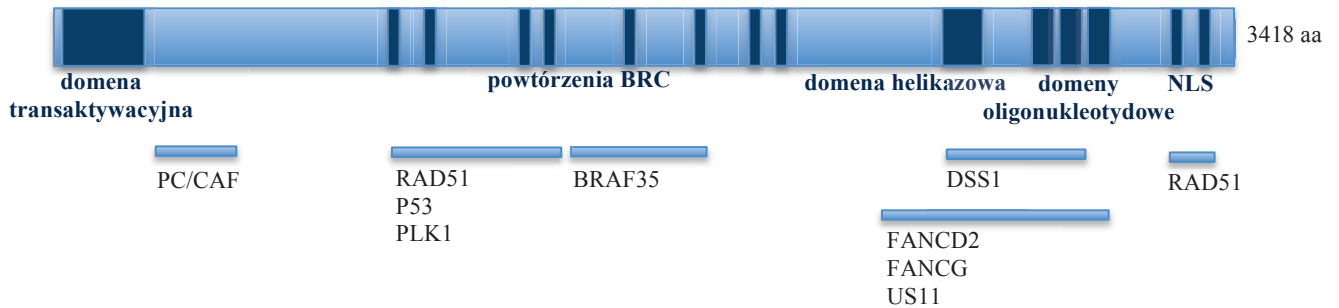
BRCA1 i *BRCA2* nie wykazują homologii zarówno względem siebie, jak i innych genów. Jedną z nielicznych cech wspólnych ich budowy jest duży ekson 11 kodujący w *BRCA1* i *BRCA2* odpowiednio 60% i 50% białka (Wooster i in., 1995; Wooster i in., 1994). Białko BRCA1 w N-terminalnej części zawiera domenę RING (Miki i in., 1994). Rola tej domeny polega na oddziaływaniu z innymi białkami, tworzeniu kompleksów niezbędnych w procesie transkrypcji oraz kontrolowaniu reakcji ubikwitynacji (Lorick i in., 1999). W centralnej części białka znajdują się dwie sekwencje NLS (ang. *nuclear localization signal*) a w części C-terminalnej dwa powtórzenia BRCT (*BRCA1 carboxylterminal*). Domena BRCT została zidentyfikowana w białkach kodowanych przez geny związane z naprawą DNA, rekombinacją oraz kontrolą cyklu komórkowego, co sugeruje jej rolę w procesie naprawy pęknięć nici DNA (Glover, 2006). Gen *BRCA2* koduje w eksonie 11 (aa 63-2280) osiem powtórzeń BRC składających się z od 30-80 aminokwasów. Ich rolą jest oddziaływanie m.in. z białkiem biorącym udział w rekombinacji np. RAD51 (Katagiri i in., 1998). W części N-terminalnej BRCA2 znajduje się domena aktywacji transkrypcji, a poprzez znajdujące się w części C-terminalnej domeny, halikazową oraz oligonukleotydowe, BRCA2 ulega połączeniom z innymi białkami (Yang i in., 2002). W tej części genu umiejscowiona jest również domena lokalizacji w jądrze, NLS. Schematyczną budowę białek BRCA1 i BRCA2 przedstawiono poniżej (Ryc. 2).

Ekspresja genów *BRCA1* i *BRCA2* jest zależna od fazy cyklu komórkowego. Poziom mRNA obu białek osiąga szczyt wzrostu w fazie S i G2, co wskazuje na ich funkcje w trakcie lub bezpośrednio po replikacji (Gudas i in., 1996; Scully i in., 1997).

BRCA1



BRCA2



Ryc. 2. Struktura białek BRCA1 i BRCA2 wraz z zaznaczonymi ważnymi domenami funkcjonalnymi. Przybliżoną lokalizację regionów ulegających interakcjom z wybranymi białkami zaznaczono w postaci bloków pod diagramami.

3.3.2.2. Funkcje białek BRCA1 i BRCA2

BRCA1 i BRCA2 są wielofunkcyjnymi białkami odgrywającymi istotne role w procesie utrzymywania integralności genomu. Zaburzenie działania któregośkolwiek z nich skutkuje zwiększeniem wrażliwości komórki na czynniki uszkodzające DNA i wywołuje chromosomowe aberracje (Patel i in., 1998; Shen i in., 1998; Xu i in., 1999). Oba białka są zaangażowane w procesy naprawy uszkodzeń DNA na drodze rekombinacji homologicznej (ang. *homologous recombination*, HR). Ponadto uważa się, że BRCA1 uczestniczy w promocji ścieżki naprawy na drodze niehomologicznego łączenia końców (ang. *non-homologous end joining*, NHEJ) (Wang i in., 2006; Zhuang i in., 2006). Funkcje BRCA1 i BRCA2 zależą od ich prawidłowych wiązań z szeregiem białek. Wykazano, że BRCA1 w połączeniu z BARD1 nabiera właściwości ligazy E3 i w formie heterodimeru bierze udział w procesie ubiquitynacji (Polanowska i in., 2006). BRCA1 oddziałuje również z kompleksem MRE11-RAD50-NBS1 oraz jest koordynatorem kompleksu BASC (*BRCA1 associated genome surveillance complex*) (Wang i in., 2000b). W wyniku działania promieniowania jonizującego BRCA1 jest fosforylowane przez ATM, co warunkuje prawidłową odpowiedź komórki na uszkodzenie genomu (Cortez i in., 1999). Dodatkowo udowodniono udział białka BRCA1 w remodelowaniu struktury chromatyny w miejscu pęknięcia nici DNA (Rogakou i in., 1998). Poprzez oddziaływanie z szeregiem czynników transkrypcyjnych BRCA1 reguluje w sposób dodatni lub ujemny transkrypcję (Hedenfalk i in., 2002). Białko to jest również zaangażowane w regulację cyklu komórkowego na drodze aktywacji punktów kontrolnych lub kierowaniu komórki na

ścieżkę apoptozy (Wang i in., 2000a). BRCA2 za pomocą powtórzeń BRC bezpośrednio wiąże się z RAD51. Doniesienia o ich kolokalizacji w jądrze komórkowym były pierwszym dowodem udziału BRCA2 w procesie naprawy DNA na drodze HR. Sugeruje się, że poprzez powtórzenia NLS białko BRCA2 umożliwia transport RAD51 na miejsce uszkodzenia DNA (Chen i in., 1998; Sharan i in., 1997).

Pomimo poznanej funkcji, jaką białka BRCA1 i BRCA2 pełnią w procesie kancerogenezy, ich znaczący wpływ na rozwój raka piersi i jajnika nie jest w pełni wyjaśniony. Uważa się, że może on wynikać ze związku pomiędzy poziomem białka BRCA1 a aktywnością hormonów (Fan i in., 2001).

3.3.2.3. Spektrum mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*

Do tej pory w genach *BRCA1/2* opisano ponad 3500 wariantów sekwencyjnych, z których większość to delecje lub insercje zmieniające ramkę odczytu oraz substytucje prowadzące do przedwczesnej terminacji translacji i powstania skróconego białka (Narod i Foulkes, 2004). Większość patogennych mutacji w genie *BRCA1* zachodzi w obrębie domen BRCT oraz RING i prowadzi do utraty części C-terminalnej białka wraz z jednym lub dwoma powtórzeniami BRCT (Szabo i in., 2004). Patogenność zmian w *BRCA2* wynika głównie z utraty sygnałów lokalizacji NLS (Spain i in., 1999). Sugeruje się, że znaczną część wszystkich zmian w genie *BRCA1* mogą stanowić duże rearanżacje. W populacjach holenderskiej, australijskiej i duńskiej stanowią one odpowiednio 27-36%, 14,9%, 12,5% wszystkich mutacji w tym genie (Hogervorst i in., 2003; Petrij-Bosch i in., 1997; Woodward i in., 2005). Wykrywane w *BRCA1/2* substytucje o typie zmiany sensu (ang. *missense*) stanowią problem diagnostyczny wynikający z trudności w ocenie biologicznego efektu tych zmian na funkcje białek. Jak dotąd tylko niewielka część wariantów *missense* została zakwalifikowana jako patogenna.

Zmienna częstość występowania określonych mutacji wynika z występowania silnego efektu założyciela w niektórych izolowanych populacjach lub grupach etnicznych. Najwyraźniej efekt ten zaznaczony jest w populacji Żydów aszkenazyjskich, u których identyfikowane są głównie trzy mutacje występujące z łączną częstością 1/40: c.68_69delAG (185delAG), c.5266dupC (5382insC) w genie *BRCA1* oraz c.5946delT (6174delT) w genie *BRCA2* (Fodor i in., 1998). Zmiana w genie *BRCA2*, c.771_775del (999del5), jest najczęściej identyfikowaną mutacją założycielską w populacji islandzkiej i wykrywana jest z około 0,5% częstością (Thorlacius i in., 1996). Silny efekt założyciela dotyczy również populacji szwedzkiej. W zachodnim rejonie tego kraju mutacja c.3171_3175dup (3171ins5) stanowi ponad 70% wszystkich mutacji wykrywanych w *BRCA1/BRCA2* (Bergman i in., 2005).

W populacji polskiej za mutacje założycielskie w genie *BRCA1* uważa się c.5266dupC (5382insC) oraz c.181T>G (300T>G), które, wraz z charakterystyczną dla zachodniopomorskich rejonów Polski mutacją c.4034delA (4153delA), stanowią 86% wszystkich mutacji wykrywanych w *BRCA1/2* w Polsce (Górski i in., 2000; Górski i in., 2004; Perkowska i in., 2003; Ratajska i in., 2008).

3.3.3. Inne geny związane z agregacją zachorowań na raki piersi i/lub jajnika w rodzinie

3.3.3.1. Geny o wysokiej penetracji: *TP53*, *PTEN*

***TP53* (Tumor protein p53)** (chromosom 17p13) jest genem supresorowym kodującym białko zaangażowane w aktywację mechanizmów naprawy DNA i indukcję apoptozy. Mutacje germinalne w tym genie prowadzą do zespołu Li-Fraumeni (LFS) cechującego się wysoką predyspozycją do licznych nowotworów (mięśniaki, białaczki nowotwory mózgu oraz piersi), występującymi również u dzieci (Malkin i in., 1990). Prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu piersi przed 30 r. ż. u chorych z tym zespołem wynosi 28-56%, natomiast życiowe ryzyko sięga 100%. Szacuje się, że mutacje w genie *TP53* odpowiadają zaledwie za około 1% przypadków rodzinnych izolowanych raków piersi, gdyż pomimo wysokiej penetracji, są rzadkie i identyfikuje się je głównie u chorych z zespołem LFS lub Li-Fraumeni-like (LFL) (Borresen i in., 1992; Easton i in., 1993).

***PTEN* (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome ten)** (chromosom 10q23) to gen, kodujący fosfatazę pośredniczącą w szlaku sygnalizacyjnym prowadzącym do zatrzymania podziałów komórkowych. Mutacje w genie *PTEN* stwierdza się u ok. 80% pacjentów z zespołem Cowdena (Liaw i in., 1997; Nelen i in., 1996). U ok. 75% chorych występują raki piersi, dodatkowo stwierdza się zmiany śluzowo skórne, endometrium oraz tarczycy. Życiowe ryzyko wystąpienia nowotworów piersi u pacjentek z tym zespołem wynosi 25-50%, a średni wiek zachorowania przypada powyżej 38-46 r. ż. (Brownstein i in., 1978; Sabate i in., 2006). Mutacje w *PTEN* nie stanowią istotnej grupy rodzinnych raków piersi poza chorymi z zespołem Cowdena i jak dotąd nie zostały opisane patogenne heterozygotyczne zmiany w tym genie.

3.3.3.2. Geny o umiarkowanej i niskiej penetracji

Mutacje w znanych genach o wysokiej lub umiarkowanej penetracji identyfikowane są zaledwie u około 30% pacjentów pochodzących z rodzin, w których występuje agregacja zachorowań na raki piersi i/lub jajnika (Easton, 1999; Antoniou i Easton, 2006). Wyniki badań wskazują, iż istnienie kolejnego genu o wysokiej penetracji „*BRCA3*” jest mało prawdopodobne (Thompson i in., 2002). Obecnie uważa się, że około 5% niewyjaśnionej części zachorowań może być wynikiem niezależnego wpływu alleli o niskiej lub umiarkowanej penetracji lub, zgodnie z teorią „modelu poligenowego”, ich koincydentalnego współdziałania (Antoniou i in., 2002; Pharoah i in., 2002; Wooster i Weber, 2003). Dodatkowo zmiany w tych genach mogą wpływać na stopień penetracji mutacji w genach *BRCA1/2* (*Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2*; CIMBA). Poszukiwania kandydatów do tej grupy oparte są na właściwościach biologicznych ich produktów białkowych i skupiają się wokół genów związanych z utrzymywaniem stabilności genomowej i naprawą DNA. Uwagę badaczy zwróciły geny kodujące białka wchodzące w interakcje z *BRCA1/2* i należą do nich: *BRIP1*, *BARD1*, *CHK2*, *PALB2* oraz *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* tworzące kompleks białkowy MRN (Nathanson i Weber, 2001).

3.3.3.2.1. Geny *BRIP1*, *BARD1*, *CHEK2* i *PALB2*

***BRIP1* (BRCA1 – interacting protein 1; inna nazwa: *BACH1*)** (chromosom 17q22) koduje białko bezpośrednio oddziałujące z *BRCA1* w procesie naprawy pęknięć nici DNA. Jego odpowiedź na uszkodzenie zbliżona jest do działania *BRCA1*, dzieli również podobny profil ekspresji (Cantor i in., 2001). Interakcje z *BRIP1* umożliwiają białku *BRCA1* prawidłową lokalizację w miejscu uszkodzenia DNA, jak również wywołują aktywację punktu kontrolnego G2/M (Yu i in., 2003). Homozygotyczne mutacje genu *BRIP1* prowadzą do zespołu Fanconiego (wariant J) charakteryzującego się m.in. predyspozycją do rozwoju nowotworów. Wyniki badań prowadzonych przez Cantor i wsp. (2001) jako pierwsze wskazały *BRIP1* jako gen, którego mutacje predysponują do rozwoju raka piersi. Zidentyfikowane zostały dwa patogenne warianty typu zmiany sensu: p.Pro47Ala i p.Met299Ile zaburzające funkcjonowanie białka (Cantor i in., 2004; Cantor i in., 2001). W kolejnej pracy wykazano obecność heterozygotycznych zmian nonsensownych (ang. *nonsense*) warunkujących dwa razy wyższe ryzyko wystąpienia raka piersi (c.141delC; c.2392C>T; c.2255delAA; IVS17+2insT) (Seal i in., 2006). Zgodnie z innymi doniesieniami, mutacje w genie *BRIP1* nie wpływają na podwyższenie ryzyka raka piersi w populacji fińskiej (Karppinen i in., 2003). Uważa się, że *BRIP1* może być genem o umiarkowanej penetracji warunkującym dwukrotnie zwiększoną podatność zachorowania na raka piersi, jednakże mutacje w tym genie są rzadko identyfikowane i stanowią niewielki odsetek dziedzicznych raków piersi i/lub jajnika.

BARD1 (BRCA1 – associated RING domain) jest genem zbliżonym w swojej funkcji, strukturze i ekspresji do genu *BRCA1* (zawiera domenę RING oraz dwa powtórzenia BRCT) (Miki i in., 1994; Wu i in., 1996). Utworzony z białek BRCA1 i BARD1 heterodimer wchodzi w skład superkompleksów białkowych i wywołuje ich poprawną odpowiedź na uszkodzenia DNA. W przypadku zaburzonego działania BRCA1, akumulowane w cytoplazmie białko BARD1 inicjuje proces apoptozy (Irminger-Finger i in., 2001; Jefford i in., 2004). Wyniki badań dowiodły, że zarówno inaktywacja *BRCA1*, jak i samego *BARD1*, wywołuje u myszy raka piersi o identycznym typie histologicznym i cechach cytogenetycznych (Shakya i in., 2008). W 1998 Thai i wsp. po raz pierwszy wykryli związek pomiędzy mutacją w genie *BARD1* a rozwojem nowotworu piersi i/lub jajnika (p.Gln564His). Badania funkcjonalne charakteryzujące wykrytą zmianę dowiodły, iż w jej następstwie zaburzony zostaje proces odpowiedzi na uszkodzenie DNA (Thai i in., 1998). Często identyfikowana zmiana: p.Cys557Ser, zgodnie z wynikami badań wielu zespołów, jest mutacją warunkującą dwukrotnie podwyższone ryzyko nowotworów piersi (Karppinen i in., 2004; Stacey i in., 2006). W badaniu pochodzącym z Polski nie stwierdzono jednak wpływu tego allela na wzrost ryzyka wystąpienia dziedzicznego raka piersi, ani również na penetrację mutacji w genach *BRCA1/2* (Jakubowska i in., 2008). W pracy pochodzącej z naszego ośrodka opisano dwie nowe, potencjalnie patogenne mutacje w genie *BARD1*. Pierwsza z nich to mutacja typu *nonsense* prowadząca do utraty obu domen BRCT (p.Gln564Ter). Druga jest zmianą *splicingową* skutkującą wycięciem sekwencji eksonu piątego (c.1315-2A>G) (Ratajska i in., 2012).

CHEK2 (CHEK2 - checkpoint kinase 2) (chromosom 22q12) to gen kodujący kinazę serynowo/treoninową zaangażowaną w naprawę DNA oraz aktywację punktów kontrolnych (Matsuoka i in., 1998). Po raz pierwszy został przedstawiony jako gen mający wpływ na ryzyko rozwoju raka piersi na podstawie badań pacjentów z zespołem Li-Fraumeni, u których nie zidentyfikowano mutacji w genie *TP53* (Bell i in., 1999). Nosicielstwo zmiany skracającej białko CHEK2, c.1100delC, wiąże się z od dwu- do trzykrotnie zwiększoną podatnością zachorowania raka piersi u kobiet i ponad dziesięciokrotnie wyższym ryzykiem tego nowotworu u mężczyzn (Meijers-Heijboer i in., 2002; Weischer i in., 2008). Mutacja p.Leu157Thr w tym genie jest również związana z predyspozycją do raka piersi i wraz z c.1100delC została opisana w populacji polskiej (Cybulski i in., 2004b). Uważa się, że mutacje w tym genie mogą tłumaczyć podłoże genetyczne około 1% spośród wszystkich zachorowań na raki piersi wśród kobiet. Zgodnie z najnowszymi wynikami badań podwyższają one 1,6-krotnie śmiertelność spowodowaną tym nowotworem oraz 3,5-krotnie ryzyko wystąpienia obustronnego raka piersi (*CHK2 Breast Cancer Case-Control Consortium*, 2012).

Gen **PALB2 (Partner and localiser of BRCA2)** (chromosom 16p12) koduje białko współdziałające z BRCA2 zapewniając jego stabilną lokalizację w miejscu pęknięcia nici DNA podczas procesu naprawy. Założycielskie mutacje typu *nonsense* wykrywane są w różnych populacjach, a ich obecność korelowana jest z od dwu- do czterokrotnym wzrostem ryzyka wystąpienia raka piersi (c.1592delT – populacja fińska; p.Gln775Ter - populacja francusko-kanadyjska) (Erkko i in., 2007; Foulkes i in., 2007). Najnowsze badania wskazują na obecność również Polskiej mutacji założycielskiej w tym genie (c.509_519delGA) (Cybulski i in., 2014). Dodatkowo opisano homozygotyczne mutacje w tym genie prowadzące do anemii Fanconiego o wariacie N (Reid i in., 2007). Najnowsze badania wskazują, że mutacje w genie *PALB2* występują u ok. 0,5-2% chorych na raka piersi oraz u 1% pacjentek z potrójnie negatywnym rakiem piersi (*triple negative breast cancer*, TNBC) (Wong i in., 2011; Wong-Brown i in., 2013). W badaniu grupy kobiet z TNBC opisano nowe mutacje skracające białko PALB2 (c.758dup i c.2390del) i zasugerowano, że germinalne mutacje w tym genie, działając jako allele niskiej penetracji, zwiększają ryzyko rozwoju tego nowotworu od półtora- do dwukrotnie (Wong-Brown i in., 2013).

3.3.3.3. Geny *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* kodujące białka kompleksu MRN

Badania nad odpowiedzią na uszkodzenia DNA wywoływane promieniowaniem UV u drożdży doprowadziły do zidentyfikowania genów zaangażowanych w jego naprawę: *MRE11*, *RAD50* i *XRS2* (bakteryjny homolog genu *NBS1*) (Ogawa i in., 1995). Wkrótce opisano analogiczne geny u ssaków kodujące białka współdziałające w postaci kompleksu MRN utworzonego z *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* (nibryny) (Dolganov i in., 1996; Ogawa i in., 1995; Usui i in., 1998).

Gen *MRE11* zlokalizowany jest w długich ramionach chromosomu 11q21. Składa się z 21 eksonów kodujących wysoce konserwatywne białko o masie 81 kDa zbudowane z 708 aminokwasów. W części N-terminalnej białka *MRE11* znajduje się domena fosfoesterazowa umożliwiająca interakcje z nibryną. *MRE11* oddziałuje z *RAD50* za pomocą domeny zlokalizowanej w części C-terminalnej otoczonej dwoma regionami przyłączającymi DNA (Williams i in., 2007) (Ryc. 3). *In vivo* *MRE11* występuje w postaci dimeru i posiada szereg biochemicznych właściwości: łączy się z wolnymi końcami DNA powstałymi na skutek podwójnych pęknięć nici DNA (ang. *double strand breaks*, DSBs), zapewnia ich wstępną obróbkę oraz wykazuje właściwości endo- i 3'-5' egzonukleazowe wobec pojedynczych i podwójnych nici DNA. Właściwości nukleazowe pozwalają na rozwijanie podwójnej helisy DNA oraz produkcję wolnych końców nici DNA (ang. *single stranded DNA*, ssDNA) odpowiednich dla białek RPA i hSSB1. Postać monomeryczna, będąca konsekwencją mutacji genu *MRE11*, zaburza działanie całego kompleksu MRN poprzez osłabienie powinowactwa *MRE11* do DNA (Williams i in., 2008). *MRE11* nie wykazuje właściwości 5'-3' egzonukleazowej niezbędnej do generowania końców 3' w procesie HR, jednakże nabiera tej aktywności poprzez interakcje z białkiem CTIP (You i Bailis, 2010). *MRE11* wraz z *RAD50* współtworzy rdzeń kompleksu MRN. Struktura rdzenia zbudowana jest z dwóch cząsteczek *MRE11* przyłączających po jednej cząsteczce *RAD50*. Nibryna przyłączana jest do rdzenia poprzez bezpośrednie interakcje z *MRE11* i tworzy ostatecznie kompleks MRN składający się z $Mre11_2Rad50_2Nbs1_2$ (van der Linden i in., 2009). Mutacje *MRE11* zaburzające stabilność kompleksu MRN powodują obniżenie poziomu *RAD50* i białka *NBS1* *in vivo*. Z kolei podwyższony poziom *RAD50* powoduje wzrost powinowactwa *MRE11* wobec DNA (Paull i Gellert, 1999).

MRE11



Ryc. 3. Struktura białka *MRE11*. Na schemacie zaznaczono domeny oraz regiony ulegające interakcjom z *NBS1* i *RAD50*

RAD50 (chromosom 5q31) jest genem zbudowanym z 25 eksonów kodujących białko o długości 1315 aminokwasów i masie 150 kDa. Wykazuje homologię do białek z rodziny SMC (ang. *structural maintenance of chromosome*), które kontrolują strukturę i dynamikę chromatyny. W końcach N- i C-terminalnych białka *RAD50* znajdują się domeny Walker A i Walker B połączone dwiema długimi domenami coiled-coil ze znajdującym się w centralnej części białka hakiem cynkowym (Ryc. 4). Na skutek skręcania się środkowych domen ze sobą, Walker A i B zbliżają się do siebie i nabierają aktywność ATPazy. Dzięki tej aktywności *RAD50* preferencyjnie łączy się i rozwija dwuniciowe końce DNA (de Jager i in., 2001; Hopfner i in., 2000). Elastyczna domena coiled-coil, przy pomocy haka cynkowego, łączy się z ramieniem drugiego białka *RAD50* podtrzymującego naprzeciwległy koniec nici DNA oddalony o maksymalną odległość 1200Å

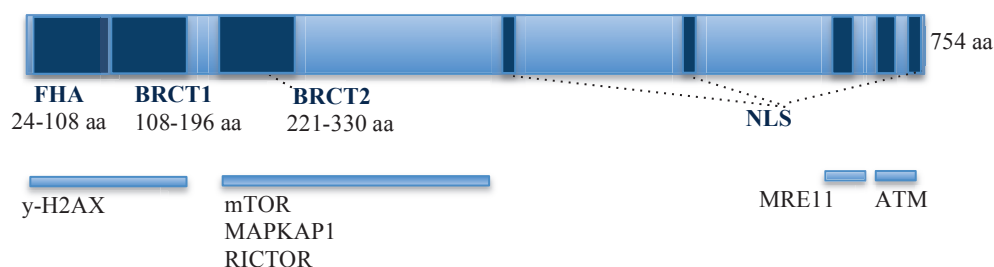
(Hopfner i in., 2002a). Mutacje w obrębie haka cynkowego prowadzą do zaburzeń w wiązaniu z drugim białkiem RAD50 oraz mogą prowadzić do zerwania interakcji pomiędzy RAD50 a MRE11 (Wiltzius i in., 2005). Rdzeń kompleksu MRN złożony z MRE11₂-RAD50₂ tworzy swoiste rusztowanie zapewniające optymalne warunki do naprawy DSBs (Ryc. 6).



Ryc. 4. Struktura białka RAD50. Na schemacie zaznaczono domeny znajdujące się na końcach N- i C- terminalnych oraz występujące w centralnej części białka haka cynkowy. Poniżej diagramu zaznaczono miejsca ulegające interakcjom z MRE11.

Gen *NBS1* (**Nijmegen breakage syndrome 1**), (zgodnie z nową nomenklaturą: *NBN*; w pracy zachowano poprzednie nazewnictwo genu) zlokalizowany jest w chromosomie 8q21 i zbudowany z 16 eksonów. Koduje nibrynę o długości 754 aminokwasów i masie 65-85 kDa. Nibryna, w części N-terminalnej, zawiera domenę FHA (ang. *forkhead-associated domain*) oraz dwa powtórzenia BRCT (ang. *BRCA1 C-terminus domain*) (Becker i in., 2006). Domeny te są silnie konserwowane wśród eukariotycznych białek związanych z naprawą DNA i regulacją cyklu komórkowego. Ich ułożenie wskazuje na funkcje białka NBS1 jako adaptera łączącego się z MRE11-RAD50 oraz umożliwiającego dalsze interakcje kompleksu MRN z grupą białek procesu naprawy DSBs (m.in. CTIP, MDC1, ATR, WRN) (Kobayashi i in., 2010; Lloyd i in., 2009; Williams i in., 2009). Kobajashi i wsp. (2004) wykazali, iż bezpośrednie oddziaływanie domen FHA/BRCT z ufosforylowanym histonem H2AX (γ -H2AX) jest odpowiedzialne za lokalizację kompleksu MRN w miejscu DSBs. W części C-terminalnej znajdują się sekwencje oddziaływujące z MRE11 i ATM oraz trzy sygnały lokalizacji jądrowej (NLS) (Ryc. 5). Bezpośrednie interakcje pomiędzy nibryną i MRE11 są niezbędne do prawidłowej lokalizacji kompleksu MRN w jądrze po zajściu DSBs (Cersaletti i in., 2000). Wykazano, że mutacje pozbawiające białko NBS1 rejonu łączącego je z MRE11 uniemożliwiają transport rdzenia kompleksu MRE11₂-RAD50₂ do jądra, przy czym zmutowana nibryna zachowuje zdolność do tego przejścia (Desai-Mehta i in., 2001). Nibryna nie wykazuje właściwości enzymatycznych, jej udział w naprawie DSBs polega na zapewnianiu prawidłowej i szybkiej lokalizacji w miejscu uszkodzenia pozostałym białkom kompleksu MRN, stymulowaniu ich aktywności, rekrutacji szeregu białek (np. ATM) oraz mediowaniu interakcji pomiędzy nimi (Falck i in., 2005).

NBS1, Nibryna



Ryc. 5. Struktura nibryny wraz z przybliżoną lokalizacją domen i miejsc ulegających interakcjom z białkami (w tym z MRE11). Miejsca interakcji z wybranymi białkami zaznaczono w postaci bloków pod diagramem.

3.3.3.4. Funkcje kompleksu MRN kodowanego przez geny *MRE11*, *RAD50* i *NBS1*

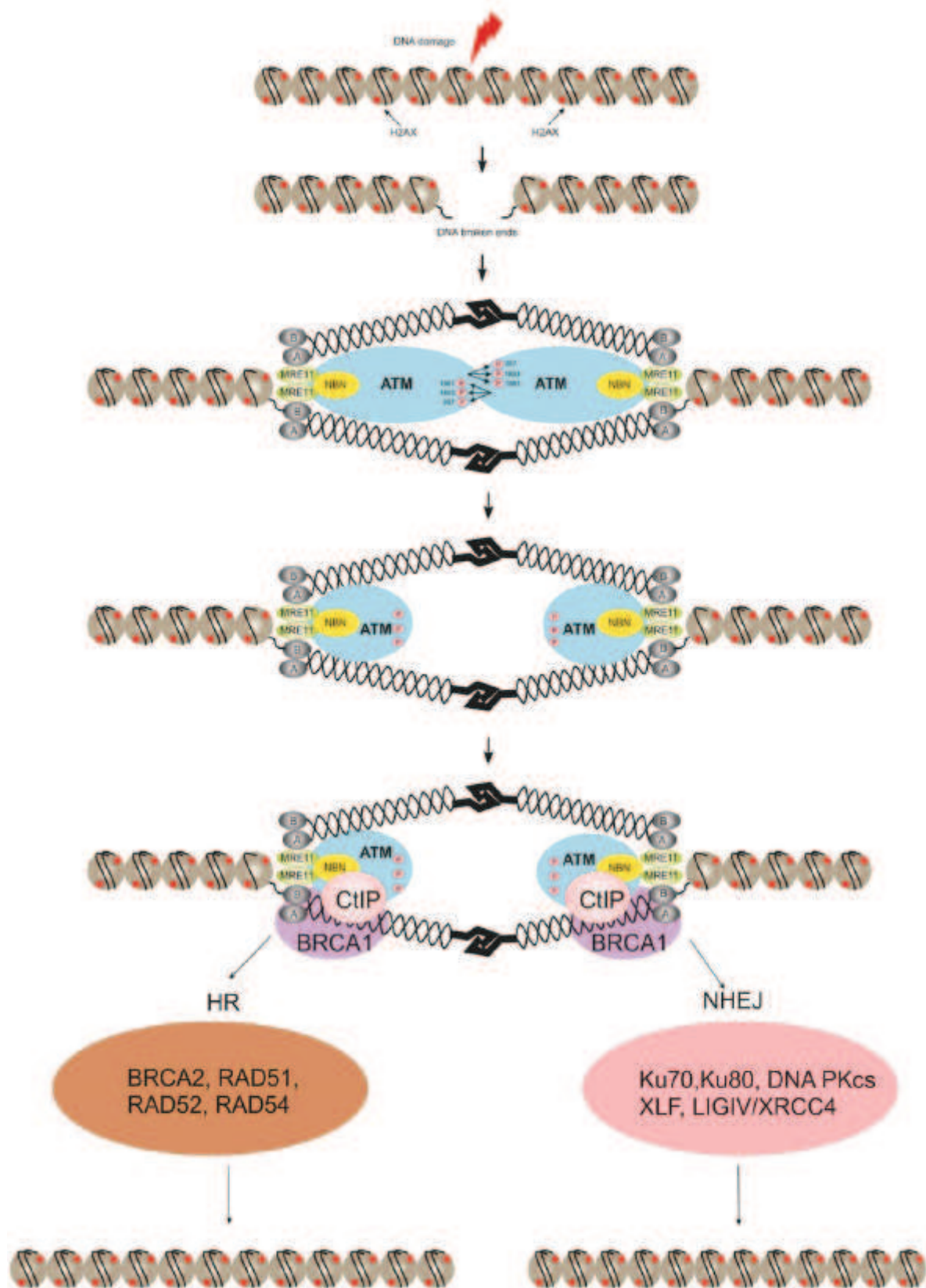
3.3.3.4.1. Naprawa DNA

Podwójne pęknięcia nici DNA mogą powstawać na skutek działania promieniowania jonizującego, genotoksycznych środków chemicznych, wolnych rodników oraz zaburzeń w czasie replikacji lub mejozy (Bierne i in., 1997; Michel i in., 1997; Sun i in., 1989; van den Bosch i in., 2003; Ward, 1988). Należą do najgroźniejszych uszkodzeń i nienaprawione prowadzą do utraty stabilności genomowej komórki, która w konsekwencji może doprowadzić do rozwoju nowotworu (Hoeijmakers, 2001). Ochrona komórki przed konsekwencjami DSBs wymaga sprawnego działania minimum trzech mechanizmów: detekcji uszkodzenia, aktywacji punktów kontrolnych oraz włączenia odpowiedniej ścieżki naprawy. W komórkach eukariotycznych istnieją dwa główne mechanizmy naprawcze uszkodzeń typu DSBs: homologiczna rekombinacja – HR i niehomologiczne łączenie końców - NHEJ. HR jest procesem wiernie przywracającym utraconą sekwencję wykorzystując siostrzaną chromatydę jako matycę. Zachodzi w fazach S i G2 cyklu komórkowego, podczas których dostępna jest homologiczna sekwencja. Naprawa NHEJ zachodzi w fazie G1, G0 i M i ze względu na niewielką dostępność matrycy jest procesem podatnym na błędy (Bernstein i Rothstein, 2009; Lieber, 2010).

3.3.3.4.2. Rola kompleksu MRN w procesie naprawy DSBs

Kompleks MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) bierze udział we wszystkich etapach odpowiedzi na uszkodzenie DNA i jest niezbędny do przeprowadzenia efektywnej naprawy DNA na drodze HR oraz NHEJ (Hopfner i in., 2002b; Williams i in., 2007; Zhuang i in., 2009). Jego szybkie pojawianie się w chromatynie jest niezależne od ATM i H2AX, co może świadczyć o tym, że kompleks ten jest pierwszym sensorem uszkodzeń typu DSBs (Petrini i Stracker, 2003). Przy użyciu techniki immunofluorescencji zaobserwowano, iż w miejscu DSBs, już w kilka sekund od zajścia uszkodzenia, akumulowane są tysiące kopii białek kompleksu MRN (Mirzoeva i Petrini, 2001; Paull i in., 2000). Ich obecność uruchamia proces monomeryzacji kinazy ATM, a następnie, poprzez interakcje z domeną C-terminalną białka NBS1, dochodzi do autofosforylacji ATM w miejscu seryny 1981 (Berkovich i in., 2007; Dupre i in., 2006; Falck i in., 2005). Aktywna kinaza ATM fosforyluje ponad 700 białek naprawy DNA (Matsuoka i in., 2007). Wykazano, że mutacje obniżające poziom komponentów kompleksu MRN prowadzą do zaburzeń działania kinazy ATM oraz jej kumulowania się w miejscu pęknięcia DNA (Uziel i in., 2003). Aktywna kinaza fosforyluje histon H2AX w miejscu DSBs, który następnie przyłącza kolejne białka (Mdc1, 53BP1, Chk1, Chk2, BRCA1 etc.), w tym również kompleks MRN, tworząc rodzaj kompleksu naprawczego (Kim i in., 2006; Paull i in., 2000).

Kompleks MRN w formie heterodimeru łączy się z końcami DNA poprzez białko MRE11 oraz uczestniczy w ich wczesnej „obróbce enzymatycznej“ (de Jager i in., 2001). Długie ramiona białek RAD50, połączone ze sobą za pomocą haka cynkowego, utrzymują wolne końce DNA zabezpieczając przed ich nadmiernym oddaleniem. Połączenie RAD50 i MRE11 wyzwala endo- i egzonukleazowe właściwości MRE11, które poprzez interakcje z CtIP rozwijają nić DNA i przygotowuje końce do naprawy (Paull i Gellert, 1999). Zależna od MRN obróbka końców DNA uruchamia kinazę ATR aktywującą kaskadę sygnałów do naprawy DNA (Ryc. 6).



Ryc. 6. Udział kompleksu MRN w procesie naprawy uszkodzeń DNA. Na rycinie uwidoczniło się przestrzenne formowanie się białek kompleksu MRN na dwóch zerwanych końcach nici DNA (Czornak i in., 2008).

Udział kompleksu MRN w utrzymywaniu stabilności telomerów u wyższych eukariota po raz pierwszy wykryto na podstawie wyników badań przeprowadzonych na ludzkich fibroblastach (Lombard i Guarente, 2000). Zaobserwowano również skrócenie telomerów w fibroblastach pacjentów z zespołem Nijmegen. Wyniki doświadczeń wykazują, że kompleks MRN reguluje aktywność szeregu białek związanych z działaniem telomerów. Wraz z kinazą ATM reguluje efekt działania białek chroniących telomery: TRF1 i TRF2 podczas fazy S i G2 cyklu komórkowego (Zhu i in., 2000). MRE11 podczas fazy G2 uwalnia białko POT1 chroniące wolne końce 3' i utrzymujące odpowiednią długość telomerów. W prawidłowych warunkach telomery są rozpoznawane przez MRN jako DSBs, jednak poprzez brak aktywacji białek takich jak TP53 lub CHK2 odpowiedź zawężona jest tylko do telomerów i nie prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego (Verdun i in., 2005).

3.3.3.5. Mutacje w genach *MRE11*, *RAD50* i *NBS1*

Występujące w genie *MRE11* homozygotyczne mutacje prowadzą do zespołu *ataxia-telangiectasia-like* (ATLD) (p.Asn117Ser, p.Arg571Ter, p.Arg663Ter) (Stewart i in., 1999). Jak dotąd zidentyfikowano 16 pacjentów z tym zespołem. Główne cechy kliniczne zespołu są zbliżone do cech charakterystycznych dla zespołu ataksja–teleangiektazja, ale ataksja mózdkowa jest wolniej postępująca, nie występuje niepełnosprawność intelektualna oraz nie stwierdza się telangiektazji. Komórki pacjentów z ATLD wykazują podwyższoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące i często identyfikowane są w nich rearanżacje chromosomów 7 i 14 (Frappart i McKinnon, 2006).

Walters i wsp. (2009) opisali pojedynczy przypadek zespołu fenotypowo zbliżonego do zespołu Nijmegen wywołanego przez homozygotyczne mutacje germinalne w genie *RAD50*. Cechą odróżniającą ten zespół od zespołu Nijmegen jest brak obniżonej odporności oraz niewystępowanie nowotworów wieku dziecięcego.

Homozygotyczne mutacje w genie *NBS1* są odpowiedzialne za występowanie dziedziczącego się autosomalnie recesywnie zespołu Nijmegen (ang. *Nijmegen breakage syndrome*, NBS) (Varon i in., 1998). NBS charakteryzuje mikrocefalia, opóźnienie rozwoju, zaburzenia odporności oraz wysokie ryzyko wystąpienia nowotworów w młodym wieku (głównie białaczek i chłoniaków). Komórki pacjentów z tym zespołem wykazują niestabilność chromosomową związaną z nadmierną wrażliwością na działanie promieniowania jonizującego (Antocchia i in., 2006). Do tej pory zidentyfikowano około 200 pacjentów z NBS, z których 90% było nosicielami homozygotycznej postaci mutacji w genie *NBS1*: c.657_661del (657del5). Wariant ten znany jest jako mutacja słowiańska, gdyż najwięcej przypadków zanotowano wśród pacjentów pochodzących z Polski, Czech i Ukrainy, co wskazuje, że delecja związana jest z efektem założyciela (Varon i in., 2000). Obserwowana częstość heterozygotycznej formy mutacji c.657_661del w Europie Centralnej i Wschodniej wynosi średnio 1/177 (Seemanova, 1990; Varon i in., 2000). W Polsce częstość allele c.657_661del wykazuje zróżnicowanie regionalne. Znana jest jego częstość dla okolic Polski północno - zachodniej (1/122), Wielkopolski (1/131), Mazowsza (1/62) i Polski północno - wschodniej (1/190) (Górski i in., 2005; Kanka i in., 2007; Steffen i in., 2004; Ziółkowska i in., 2006).

W 2004 roku Shimada i wsp. (2004) opisali przypadek dziecka z anemią aplastyczną będącego nosicielem zmiany p.Ile171Val na dwóch allelach genu *NBS1*. Częstość występowania tej mutacji w Polsce wynosi od 0,2-1,38 (Ziółkowska i in., 2006; Kanka i in., 2007).

Dotychczas zidentyfikowane geny, których mutacje predysponują do wzrostu ryzyka zachorowania na raki piersi i/lub jajnika wciąż stanowią jedynie niewielką część poznanego dziedzicznego podłoża tych nowotworów (Antonioni i Easton, 2006; Thompson i Easton, 2004). Uważa się, że za część zachorowań odpowiadają mutacje w genach o niskiej penetracji mogące działać niezależnie, w układach wieloczynnikowych lub jako modyfikatory ryzyka rozwoju raka wśród nosicieli mutacji w *BRCA1/2* (Pharoah i in., 2008). Rozpoznanie genów niskiej penetracji jest utrudnione, gdyż obecne w nich mutacje rzadko powodują powstanie wyraźnie obciążonego rodowodu. Z tego powodu wykrycie tego typu genów metodami konwencjonalnymi, jak na przykład analiza sprzężeń, jest mało prawdopodobne. Do odkrycia nowych genów – kandydatów prowadzić może analiza rodzin pacjentów obciążonych recesywnie dziedziczącymi się syndromami genetycznymi związanymi z rozwojem raka piersi. Dodatkowym problemem utrudniającym

identyfikację alleli o niskiej penetracji jest genetyczna heterogenność oraz zmienność populacyjna, dlatego duże znaczenie mają badania prowadzone na izolowanych populacjach.

Detekcja alleli o niskiej penetracji skupia się głównie na analizie genów wyselekcjonowanych na podstawie ich biologicznych funkcji i wymaga prowadzenia analiz na dużych grupach badanych (Yoshida i Miki, 2004). Odpowiednim podejściem jest analiza nie wybranych, lecz całych części kodujących wyselekcjonowanych genów wraz z otaczającymi je fragmentami intronów w celu poszukiwania potencjalnych patogennych mutacji. Geny *MRE11*, *RAD50* oraz *NBS1* należą do grupy genów, których mutacje mogą predysponować do zwiększonego ryzyka zachorowania na dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika.

4. CEL

Określenie częstości występowania wariantów sekwencyjnych w obrębie sekwencji kodujących genów *MRE11*, *RAD50* oraz *NBS1* w grupie wyselekcjonowanych pacjentek chorych na rodzinne raki piersi i/lub jajnika.

5. MATERIAŁ I METODY

5.1. Materiał

Grupę badaną stanowiło 109 pacjentek z Polski północnej z silną rodzinną agregacją zachorowań na raki piersi i/lub jajnika. Chore były kwalifikowane do badania w latach 1999-2007 spośród pacjentek Onkologicznej Poradni Genetycznej Wojewódzkiego Centrum Onkologii w Gdańsku przez dr n. med. I. Brożek.

Wszystkie pacjentki, po zapoznaniu się z planem projektu, wyraziły pisemną zgodę na wykonywanie badań molekularnych zatwierdzoną przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy GUMed (NKEBN/269/2010).

W przypadku wykrycia potencjalnie patogennej mutacji pacjentki były wzywane w celu powtórnego pobrania krwi. Jeżeli wykonanie badania u osoby chorej nie było możliwe, kwalifikowano zdrowe, najbliższe krewne.

W celu określenia częstości występowania wybranych mutacji w populacji ogólnej przeprowadzono badania w grupie kontrolnej, którą stanowiło 300 anonimowych próbek (wysuszone plamy krwi) będących pozostałością po rutynowych badaniach przesiewowych w kierunku fenyloketonurii u noworodków z województwa pomorskiego. Materiał uzyskano za pośrednictwem Pracowni Badań Przesiewowych i Hormonalnych Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie (kierow. dr n. med. M. Ołtarzewski).

Do oceny częstości występowania dwóch mutacji w genie *NBS1* (c.657_661del; p.Ile171Val) w populacji północnej Polski posłużono się wynikami uzyskanymi w badaniu tej samej grupy kontrolnej i opisanymi przez nasz ośrodek w 2010 roku (Kanka i in.).

5.1.1. Kryteria rodowodowe

Pacjentki zakwalifikowane do badania spełniały jedno z poniższych kryteriów rodowodowych dotyczących krewnych I° i II°:

- co najmniej trzy zachorowania na raka piersi w rodzinie, w tym jedno zachorowanie przed 50 r. ż.
- co najmniej dwa zachorowania na raka jajnika w rodzinie, w tym jedno zachorowanie przed 50 r. ż.
- co najmniej jedno zachorowanie na raka piersi i jedno na raka jajnika w rodzinie
- jedna osoba w rodzinie, u której rozpoznano zarówno raka piersi, jak i jajnika
- co najmniej jedno zachorowanie na raka piersi u mężczyzny i jedno u kobiety w tej samej rodzinie.

5.1.2. Charakterystyka badanych kobiet

Spośród 109 zakwalifikowanych do badania kobiet 67 pochodziło z rodzin silnie obciążonych rakiem piersi, 37 z rodzin z agregacją zachorowań na raki piersi i jajnika oraz cztery z rodzin, u których zanotowano wyłącznie zachorowania na raka jajnika. Średni wiek zachorowania na raka piersi wynosił 46,1 lat (od 27 do 75 lat), na raka jajnika 44,1 lat (od 29 do 65 lat). W badanej grupie było 20 nosicieli mutacji w genie *BRCA1* oraz pięć w genie *BRCA2*.

5.1.3. Aparatura

Tab. 2. Spis używanej aparatury.

Aparatura	Producent
Sekwenator automatyczny ABI PRISM 310 Termocykler GeneAmp PCR System 2700 Termocykler GeneAmp PCR System 2720	Applied Biosystems
Komora do elektroforezy agarozowej SubCell GT Zasilacz PowerPac 3000/300	Bio-Rad
Pipety (zakres 2-10µl – 100-1000µl) Termomikser Comfort Wirówka 5810R Wirówka z chłodzeniem 5804 Wirówka MiniSpin plus	Eppendorf
Pipety (zakres 2-10µl – 100-1000µl) Wirówka GmC Lab Worteks GV Lab	Gilson
Aparat do oczyszczania i dejonizacji wody HLP ₅ Worteks	Hydrolab Polska
Cieplarka	Ika
Termocykler PTC-200 DNA Engine	Laborgerate Berlin
Wirówka 15-Mini	MJ-Research
Spektrofotometr NanoDrop-1000	MPV
DHPLC System WAVE 3500	NanoDrop Technologies
Transiluminator M-26X	Transgenomic Ltd
System do wizualizacji żeli BioDoc-It 220	UVP
Oprogramowanie do transiluminatora TS Software	
Chłodziarko-zamrażarka	Vestfrost

5.1.4. Odczynniki

Tab. 3. Spis stosowanych odczynników.

Odczynnik	Producent
Zestaw Clean-up	A&A Biotechnology
Zestaw ExTerminator	
Zestaw Gel-out	
Zestaw Sherlock AX	
10x EDTA bufor	Applied Biosystems
5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	
Kapilara 47cm x 50µm	
Polimer POP-4	
Probówki Tempus™ Blood RNA Tube	
Zestaw Tempus Spin RNA Isolation	
Odczynnik do obrazowania prążków DNA w żelu GelRed	Biotium
Marker wielkości M100-500	DNA Gdańsk II
10x bufor	Fermentas
dNTPs (100µM)	
Marker wielkości Gene Ruler DNA Ladder Low Range	
MgCl ₂ (25mM)	
Taq Polimeraza DNA (5U/µl)	
Startery	IBB PAN, Warszawa
Polimeraza 2x KAPA Blood PCR Mix B	Kapa Biosystems
Chloroform	Merck
Izopropanol	
Alkohol etylowy 96%	POCH Gliwice
GoScript Reverse Transcription System	Promega
Agaroza Basica	Prona
Zestaw High Pure FFPE RNA Micro	Roche
Błękit bromofenolowy	Sigma-Aldrich
Chlorek amonu	
Chlorek sodu	
Cyjanol ksylenu	
EDTA	
Kwas borowy	
Octan sodu	
Proteinaza K	
Puromycyna	
Sacharoza	
SDS	
TRIS BASE	
Wodorowęglan potasu	
Zestaw WAVE Optimised Buffers	Transgenomic Ltd

5.1.5. Roztwory

Tab. 4. Spis oraz skład używanych roztworów.

Roztwór	Skład	Ilość odczynnika
Bufor 5x RBC (1000ml)	NH ₄ Cl	41,6g
	KHCO ₃	4,6g
	0,5M EDTA, pH8.0	20ml
	woda	do 1000ml
Bufor 5x TBE	TRIS BASE	54g
	kwasic borowy	27,5g
	0,5M EDTA, pH8.0	20ml
	woda	do 1000ml
Bufor 50x TAE (1000ml)	TRIS BASE	242g
	lodowaty kwas octowy	57,1ml
	0,5M EDTA, pH8.0	100ml
	woda	do 1000ml
Bufor do proteiny K	NaCl	100mM
	Tris HCl, pH8.0	10mM
	EDTA, pH8.0	25mM
	SDS	0,5%
6x bufor obciążający	błękit bromofenolowy	0,25%
	cyjanol ksylenu	0,25%
	sacharoza	40%
10% SDS (100ml)	SDS	20g
NaCl/EDTA	NaCl	75mM
	EDTA	1mM

5.2. Metody

5.2.1. Izolacja DNA z limfocytów

DNA izolowano metodą trawienia proteinazą K, ekstrakcji fenol/chloroform i precypitacji etanolem (Tab. 5).

Tab. 5. Protokół izolacji DNA ze świeżej krwi obwodowej.

1. 10ml krwi żyłnej pobranej na EDTA przenieść do probówki o pojemności 15ml.
2. Wirować przez 10 min. (3220 x g, +4°C), usunąć supernatant.
3. Osad pozostały na dnie probówki zalać 10ml buforu lizującego (1 x RBC), wymieszać.
4. Inkubować przez 10 min. w +4°C.
5. Wirować przez 10 min. (3220 x g, +4°C), zlać supernatant.
6. Powtarzać płukanie (5ml 1 x RBC) i wirowanie (3220 x g, +4°C) do momentu uzyskania białego osadu.
7. Do osadu dodać 5ml NaCl/EDTA, 500µl 10% SDS i 12µl proteiny K (20mg/ml).
8. Inkubować przez noc w +37°C.
9. Dodać 3ml fenolu (pH7.9), wytrząsać przez 20 min., wirować (15 min., +4°C, 3320 x g).
10. Górną warstwę przenieść do probówki.
11. Dodać 5ml chloroformu.
12. Wytrząsać (30 min.) i wirować (10 min., 4°C, 3320 x g).
13. Powtórzyć dwukrotnie czynność z pkt. 12.
14. Górną warstwę przenieść do nowej 15ml probówki.
15. Dodać 5ml izopropanolu, wymieszać, inkubować 30 min. (-20°C).
16. Wirować (30 min., 3320 x g, +4°C).
17. Wytrącone DNA przenieść do probówki 1,5ml.
18. Zalać 1ml 70% etanolu i wirować (15 min., 20817 x g).
19. Odciągnąć supernatant.
20. Osad suszyć pod wyciągiem, następnie rozpuścić w 300µl wody.

Przy użyciu spektrofotometru NanoDrop–1000 prowadzono pomiar ilościowy oraz jakościowy kwasów nukleinowych. DNA następnie doprowadzano do roboczego stężenia dla reakcji PCR (30ng/µl).

5.2.2. Izolacja RNA z limfocytów krwi obwodowej

W celu zablokowania ewentualnego procesu NMD (ang. *Nonsense Mediated Decay*) próbki krwi pobierano do probówek TempusTM. Krew izolowano bezpośrednio po pobraniu przy użyciu zestawu AppliedBiosystems Tempus Spin RNA wg protokołu załączonego do opakowania.

5.2.2.1. Synteza cDNA

Do syntezy cDNA użyto zestawu GoScript Reverse Transcription System. Protokół postępowania był zgodny z ulotką załączoną przez producenta.

5.2.3. Amplifikacja fragmentów DNA techniką PCR

Reakcje PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych przy pomocy programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) na podstawie sekwencji genów *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* uzyskanych z bazy internetowej Ensembl (<http://www.ensembl.org>; *MRE11*: ENSG00000020922, *RAD50*: ENSG00000113522, *NBS1*: ENSG00000104320).

Ze względu na krótką sekwencję intronową pomiędzy eksonami 18 i 19 genu *RAD50* oraz 2 i 3 genu *MRE11* eksony te amplifikowano jako jeden amplikon. Ekson 11 genu *NBS1*, z uwagi na jego długość, podzielono na dwie części. Profil termiczny reakcji dla każdego amplikonu wstępnie ustalano empirycznie, a następnie optymalizowano przy użyciu bloku gradientowego. Warunki temperaturowe reakcji przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 6).

Tab. 6. Profil termiczny reakcji PCR amplifikowanych fragmentów genów *MRE11*, *RAD50* i *NBS1*.

Temperatura (°C)	Czas (min.)	Liczba cykli
95	7,00	-
95	0,30	35
T _A *	0,30	
72	0,30	
72	7,00	-
4	-	-

*T_A (°C) – Temperatura przyłączania starterów. Spis temperatur dla poszczególnych amplikonów genów *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* umieszczono w tabelach 8-10.

Reakcję PCR prowadzono w cienkościennych probówkach o pojemności 200µl. Końcowa objętość reakcji wynosiła 25µl. W celu sprawdzenia prawidłowości przeprowadzonej reakcji PCR, każdorazowo do amplifikowanego fragmentu dołączano kontrolę negatywną reakcji PCR, w której do mieszaniny reakcyjnej zamiast DNA dodawano identyczną objętość wody destylowanej. Skład mieszaniny reakcyjnej różnił się dla poszczególnych fragmentów stężeniem jonów magnezu. Przed dalszą analizą, w celu sprawdzenia czystości uzyskanych produktów, prowadzono wizualizację fragmentów reakcji PCR na 2% żelu agarozowym. Tabela 7 przedstawia skład mieszaniny PCR w zależności od stosowanego stężenia jonów magnezu.

Tab. 7. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR w zależności od stężenia jonów magnezu.

Składnik mieszaniny	Objętość/próbkę [μ l]					
ddH ₂ O	19,4	18,9	18,4	17,7	17,2	16,4
10 x PCR bufor	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl₂ [25mM]	1,5	2	2,5	3	3,5	4
dNTP mix [10mM]	0,5	0,5	0,5	1	1	1
Starter F [10 μ M]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Starter R [10 μ M]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polimeraza Taq [5U/ μ l]	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
DNA [30ng/ μ l]	1	1	1	1	1	1

5.2.4. Wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (ang. *denaturing high performance liquid chromatography* – DHPLC)

Technikę DHPLC wykorzystano do wykrywania zmian w sekwencjach nukleotydów w obrębie większości amplikonów dla genów *MRE11*, *RAD50* i *NBS1*. W przypadkach fragmentów wymagających pokrycia przez więcej niż trzy domeny topnienia wybierano metodę sekwencjonowania. Optymalizację DHPLC wykonano przy zastosowaniu oprogramowania Tansgenomic Navigator™ Software. Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu WAVE DNA Fragment Analysis System. Próbkę wykazującą odmienny wzór na chromatogramie były ponownie amplifikowane metodą PCR, a następnie poddawane reakcji sekwencjonowania. Warunki amplifikacji poszczególnych fragmentów, informacje na temat zastosowanej metodzie analizy (DHPLC lub sekwencjonowania bezpośredniego) oraz ewentualnych warunków analizy przedstawiono w tabelach poniżej (Tab. 8-10).

Tab. 8. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji, oczekiwane długości amplifikowanych fragmentów oraz warunki rozdziału na DHPLC dla fragmentów genu *MRE11*.

Amplikon	Starter F (<i>forward</i>) (5' – 3')	Starter R (<i>reverse</i>) (5' – 3')	*T _A (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość na próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Metoda analizy	Temp. rozdziału na DHPLC (°C)
ex_1	GTTCGTCCTCCTAGCCCTGCTC	TCTTCCCGAGGTTCCAGHTA	63	2,5	391	DHPLC	61,3/62,1
ex_2-3	TGGGTGCTTAGATGAAAAATGA	TGATCACAGTTGACGAGCCTTT	56	2,5	327	DHPLC	52,6/56,5/59,6
ex_4	TGTCCTCAATTTGTTTGAATATCCCTT	AGGCAAGGTAAGCACCTGAG	62	2,5	315	DHPLC	54,1/57
ex_5	CCAGATTGAAAAGTCCCTTTG	GGAAGGCCAAAACAGTTGTGTG	58	2,5	408	DHPLC	54,2/55,2
ex_6	TGCAGTTTGCCTATGATTGC	AAGGCATGCTTCCACAGAC	56	2,5	262	DHPLC	55/56,2
ex_7	CAGGTGATACGATATTCATGCAG	GAATAAGGTTTGCCCCCATTTT	57	2,5	324	DHPLC	54,2/56,8
ex_8	GAACTGCAACATACCCACTT	TGCATTTGACAACCTTGAAGA	58	2,5	388	DHPLC	53,6/55,5/56,3
ex_9	TCCTGTGCACACTTCTGCT	AGCGGTAACCTTAACATAGGC	65	2,5	416	DHPLC	53,9/54,9/56,3
ex_10	AAGCTTTCGTTTGCACATCA	TCAACATAAAAGGCTTCCCTCT	65	2,5	342	Sekwencjonowanie	-
ex_11	AAGCTGCTATTCAGCCAAAGTT	CCGATGGTGAATGCTCTTCT	62	2,5	275	Sekwencjonowanie	-
ex_12	TAAACACTGTGAATACTGAAGG	TTCCCACTGTCAAATTTGTTAAGA	56	1,5	356	Sekwencjonowanie	-
ex_13	TGGCCTTACCTTCTCCACTG	GCAGCAACTGCAAAATGAAATG	62	2,5	353	Sekwencjonowanie	-
ex_14	TTTGGTAAATTTCCCTTGCTCATC	TGAGAAAAAACTAAAACAATCAGAGAG	58	2,5	373	Sekwencjonowanie	-
ex_15	CATTCTTAATTTAGTACCCCTTG	ACCCAGCTCACTCCCTATCC	56	2,5	263	DHPLC	58,5/60
ex_16	CCACTGTGCAGCCTCCTTT	TTCAACTTGACAAGATCTAATTCCTG	58	2,5	425	DHPLC	53,4/55,2/58,7
ex_17	TGCTGGGTTTTTACAGACAAAATAT	AAGGGCTACCAATGGTGATT	62	1,5	283	DHPLC	53,2/54,6/55,6
ex_18	GGCATCATTCAGTTTTCGAG	CCTTCCAGCTTTAATGTTCCA	58	2,5	297	DHPLC	54,5/57
ex_19	CGTGTAATTCATTTCTCAITTTCA	CCCTTGGTCTGTTTTCATTC	58	2,5	300	Sekwencjonowanie	-
ex_20	TGCTGGATTGAAAAAAGTTAGCC	CCTGCACATGTACTCCCTGA	58	2,5	299	DHPLC	51,4/54,6/57,5
ex_21	CACTGGTATTGTTTGGCCATA	TGGAGTTATGCTCAGGAAACA	62	2,5	300	DHPLC	54,9

*T_A(°C) – temperatura przyłączenia starterów

Tab. 9. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji, oczekiwane długości amplifikowanych fragmentów oraz warunki rozdzielenia na DHPLC dla fragmentów genu *RAD50*.

Amplikon	Starter F (<i>forward</i>) (5' – 3')	Starter R (<i>reverse</i>) (5' – 3')	*T _A (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość na próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Metoda analizy	Temp. rozdzielenia na DHPLC (°C)
ex_1	CTTGCTTCGGCCTCAGTT	TAGGGACGCTTCCTGCTCCTA	62	2,5	296	DHPLC	59,3/59,7
ex_2	TTCTGTGAACTTACAGCATTAACACTT	TTTTCCAGTGCCAAAGTTTTCT	62	2,5	340	DHPLC	51,2/52,7/55,5
ex_3	TGCCTTTTCTCAGAACCAAC	GAAAACAACCCATCAACTTACAGACC	62	2,5	296	DHPLC	55/56,8/58
ex_4	GGATAGGTGAAGGGCCTTTTT	AAAAAGAAGCATCCAAAATTGC	62	2,5	380	DHPLC	53,1/55,5/57,5
ex_5	GTGACAGCATAATATCCCACCTG	TTGATTTAGCCAGTCCACGA	62	2,5	387	DHPLC	53,5/55,2/55,7
ex_6	TGCCTGGACCTGGAGTATCT	AGTTGGATGGCAAAAATGGAT	62	2,5	298	DHPLC	54,5/55,5
ex_7	GGTTTGGTTTATATTTGATACCTCA	TCCTTGGAGATTCITCAITCA	62	2,5	328	DHPLC	56,1
ex_8	CGTGAATCTGCAGCTATCTCAA	ATGCCAAAATGGAGTCCAAAC	62	2,5	359	DHPLC	57/58
ex_9	TGTACATATATTCCTTTTGGCAATTA	AAAATGCTATAATCTTAGGATCAAAAA	62	2,5	379	Sekwencjonowanie	-
ex_10	TCTTGTGGATGCAAAACAGTAAAT	AGTCTAIGACTTATGAGTGCAAGGT	62	2,5	389	Sekwencjonowanie	-
ex_11	GAAAGACCATCCCCACTTGA	AAAACAATTAACAGAGTAAGCATGAA	65	1,5	396	DHPLC	51,5/53/55,5
ex_12	TTTTTGCTACTCAAAATTTTCAA	TTCCCCATCCCTTAACAGTTACC	62	2,5	329	DHPLC	53,5/55,5/57
ex_13	AGAAAAAGATACAACCCGTATTCAGA	ATCTGCCCAAGCATGAGAT	62	2,5	394	DHPLC	52/57,9/58,8
ex_14	TCTTCCATAAAAATACATAAAGCTCAGTC	TTTTTAACTCTCACACTTCAAAITCA	62	2,5	344	Sekwencjonowanie	-
ex_15	TTTGCTAAAAATGTATCTAGAAAATGG	AAAATTGACTGTAAAAGGCATGTG	62	2,5	334	DHPLC	52/56,8/58
ex_16	CCGATAAAAAATGGGAAGAATGA	TGGGTGACAGAACGAGACTG	65	2,5	364	Sekwencjonowanie	-
ex_17	GACTGTGAAGTCTGACCCCTAA	AGTGTCGACGTTGGTGCTAT	65	1,5	257	DHPLC	52,1/54/55
ex_18 + ex_19	GTGTTTACTGTGCTCTCCTGTT	TGCATTTCTATTCAAATGGATCCT	62	2,5	445	DHPLC	52,5/53,2/54,2
ex_20	CCAGTTGCCCTGTACAGATTTT	CAGGCTGAGGCTAAAATTCCTT	58,4	2,5	300	DHPLC	52,4/55,2
ex_21	AAAATCTATGACTTTTCCACTTCAGG	AGCCTGGGAAACAAAGAGTGA	65	1,5	432	DHPLC	54,1/55,2
ex_22	ACCAATGAAAAATATTGAGGAAAGTT	TGAGAGGTCAATAAGGGGAAGA	62	2,5	289	DHPLC	48,5/54,5/59,6
ex_23	GGCTTACTTGATATGTTTGTAAATGA	CCACTGCACCTGATGTTTGTTT	58,4	2,5	295	DHPLC	56,8/61
ex_24	ATCATGTCAGGACTGCTTGC	TTTTGAAAGAACTATCACAACTGT	65	1,5	285	Sekwencjonowanie	-
ex_25	TTTGCGGTGACTTTTCAAAT	GCAATCTGCAAAATTTTCAAGTG	58,4	2,5	449	DHPLC	53,3/57,1

*T_A(°C) – temperatura przyłączania starterów

Tab. 10. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji, oczekiwane długości amplifikowanych fragmentów oraz warunki rozdzielenia na DHPLC dla fragmentów genu *NBS1*.

Amplikon	Starter F (<i>forward</i>) (5' – 3')	Starter R (<i>reverse</i>) (5' – 3')	*T _A (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość na próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Metoda analizy	Temp. rozdzielenia na DHPLC (°C)
ex_1	ACTCCGGCTCATCCAAG	ATACAGCGTACTCGCCGCTTCT	50	3,0	328	DHPLC	65,8/66,9/67,8
ex_2	TTACATGTATGTGTGTTCT	CTCTCTCACATACAAACCAA	63-56	2,5	293	DHPLC	55/56,1/58
ex_3	TTTTCTTTTGAAAAGCTTTTCT	CATTAATCAGAAAATATCATTTTCCCTTT	63-56	2,5	310	DHPLC	54,6/56,7
ex_4	AGTTTTAAAGTACTAAAAATTGCCAATCT	AAAGGGATGGAGTGGGTA	63-56	2,5	376	DHPLC	54/56,1
ex_5	GGATGTAAACAGCCTCTTTGTAGT	AAACAAGCATTAAAAAGGGAAATTA	63-56	2,5	493	DHPLC	52,1/53,6/56,9
ex_6	TCAGATAGTCACTCCGTTTACAAATTT	CCCCAAAATGAAAATACGTTAAACAA	63-56	3,0	294	DHPLC	51,7/53,5/55,9
ex_7	TGTTTCCCAAAATCAAATTTCTTATG	TGTTAGGTGAAAAGCAACAAAAA	63-56	3,0	352	DHPLC	52,9/55/57
ex_8	GGTTGCTTTTATCTTGACATTATCTGA	CCCCTAGCAAGTATATGAGTAACG	50	2,5	269	DHPLC	51,6/53,7/57,5
ex_9	TCTAACAAATTTAAGTGACCAGATGTT	TGATAAAGGGCAATTACTTCTCTGA	63-56	2,5	291	DHPLC	56/58,6
ex_10	GAACATAATTAACGATCTTTGTTTCTCT	GACTAAAGACAATAACCAITCTACAACA	63-56	3,0	439	DHPLC	56,6/55,3
ex_11A	TGAATATTGCCAAACTAAATGGT	ACATCATCCATTTCCCTTTTTT	63-56	3,0	348	DHPLC	53,9/55,9/57,3
ex_11B	TGGAAAAATAAGGAGCAGCA	CAATACAAAAATCGAAAAGTACCCTGTT	63-56	2,5	420	DHPLC	55/55,7
ex_12	TGCCTGGTCATACATAACATGA	CCTAAGAAATGTAAAATCACAATAATTG	63-56	2,5	299	DHPLC	53,5/55,3
ex_13	AGATTCCCAAAATGACAAAGTGA	TGCTTTTATCTTTGTTTAGCATCA	50	3,0	314	DHPLC	54,9
ex_14	GGCACTTATGCATGATTTACCA	AATTTGCTTGAAGGCCACCATAA	63-56	1,5	291	DHPLC	53,8/57,8/58,5
ex_15	CAGTGACCTATCACTATAGCAATTCA	TGAGGACAGAAAGAAAACAATTCT	60-53	2,5	226	DHPLC	54,6/56
ex_16	TGACTACAGTTTGAAAGTTCTTTTACC	TGTTGGCCTGAAAGTAGATGCT	63-56	2,5	178	DHPLC	55,3/56,4

*T_A(°C) – temperatura przyłączania starterów

5.2.5. Sekwencjonowanie wybranych produktów PCR

Reakcji sekwencjonowania poddawano te amplikony, które z uwagi na złożony profil topnienia, wymagały rozdziału chromatograficznego przy zastosowaniu czterech lub więcej różnych temperatur. Sekwencjonowaniu poddawano również próbki, dla których zaobserwowano odmienny wzór rozdziału chromatograficznego. W tym celu, po ponownej amplifikacji i sprawdzeniu obecności produktu na żelu agarozowym, próbki oczyszczano przy użyciu zestawu Clean-up, a następnie przeprowadzano reakcję sekwencjonowania dwukierunkowego (ze starterem sensownym i antysensownym). Składniki mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji przedstawiono w tabelach poniżej (Tab. 11, 12).

Tab. 11. Składniki mieszaniny reakcyjnej stosowanej w metodzie sekwencjonowania.

Składnik mieszaniny	Objętość/próbkę [μl]
BigDye Terminator Reaction Mix v3.1	1
5x BigDye Terminator sequencing buffer 2,5x	4
Starter [1μM]	2
Matrycowe DNA (oczyszczony produkt PCR)	2
Woda	11

Tab. 12. Profil termiczny reakcji sekwencjonowania.

Temp. (°C)	Czas (min.)	Liczba cykli
95	2,00	-
95	0,10	
50	0,05	25
60	4,00	
4	-	-

W celu usunięcia nadmiaru znakowanych dideoksynukleotydów (ddNTPs) produkt reakcji oczyszczano przy użyciu zestawu ExTerminator, postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Oczyszczoną próbkę następnie denaturowano w temperaturze 95°C przez trzy minuty, po czym schładzano do +4°C. Próbkę analizowano w sekwencjonatorze automatycznym ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) przy użyciu oprogramowania ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0 oraz ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software v3.74. Elektroforogramy analizowano wraz z sekwencją prawidłową uzyskaną z bazy danych Ensembl za pomocą programu Sequencher v. 4.7 (demo).

5.2.6. Analiza cDNA

Analizę cDNA prowadzono w celu oznaczenia wpływu wykrytych zmian na proces składania mRNA. Analizie poddawano warianty eksonowe, wskazane przez program ESEfinder jako mające potencjalny wpływ na *splicing* lub zmiany zachodzące w sekwencjach konsensus. Do dalszych badań wytypowano cztery mutacje w genie *RAD50*: p.Pro250Leu (ekson piąty), c.756+5C>T (intron szósty), c.1052-2A>C (intron ósmy), p.Arg365Gln (ekson ósmy), wariant genu *MRE11*: p.Ala492Asp (ekson 14) oraz zmianę w genie *NBS1*: p.Arg169His (ekson piąty). Z powodu braku dostępności materiału do badań mutacji p.Arg169His analiza cDNA w tym przypadku nie była możliwa.

Skład mieszaniny i warunki reakcji PCR do amplifikacji fragmentów sekwencji cDNA genów *RAD50* i *MRE11* przedstawiono w tabelach poniżej (Tab. 13-15).

Tab. 13. Warunki amplifikacji fragmentów cDNA genu *RAD50* i *MRE11*.

Temp. °C	Czas (min.)	Liczba cykli
94	7,00	-
94	0,30	40
T _A *	0,30	
72	1,30	
72	7,00	-
4	-	-

*T_A(°C) – Temperatura przyłączania starterów. Spis temperatur dla poszczególnych amplikonów cDNA genów *RAD50* i *MRE11* umieszczono w tabeli 15.

Tab. 14. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do reakcji PCR z cDNA genu *RAD50*.

Składnik mieszaniny	Objętość/próbkę [μl]
ddH ₂ O	17,7
10 x PCR bufor	2,5
MgCl ₂ [25mM]	3
dNTP mix [10mM]	1
Starter F [10μM]	1
Starter R [10μM]	1
Polimeraza Taq [5U/μl]	0,2
cDNA	2

Tab. 15. Sekwencje i miejsca zakotwiczenia starterów oraz prawidłowe długości amplifikowanych fragmentów cDNA genów *RAD50* i *MRE11*.

Mutacja	Miejsca zakotwiczenia starterów	Starter F (<i>forward</i>) (5' – 3') Starter R (<i>reverse</i>) (5' – 3')	*T _A (°C)	Długość prawidłowego produktu (pz)
<i>RAD50</i>				
c.1052-2A>C	F- Ex 7 R- Ex 9	F: TGTCATCGTGAAGCTGGAAAAA R: TTATTACTTCCATTTTAAAGGTTTCTAC	55	500
c.1094G>A (p.Arg365Gln)	F- Ex 7 R- Ex 9	F: TGTCATCGTGAAGCTGGAAAAA R: TCTTGAAGCTGGACCAGGAGC	56	467
c.756+5C>T	F- Ex 4 R- Ex 6	F: GGAAAGGCTTTGAAGCAAAA R: TAAAGCCTTGGATAGCCGAA	55	340
c.749C>T (p.Pro250Leu)				
<i>MRE11</i>				
c.1475C>A (p.Ala492Asp)	F- Ex 13 R- Ex 15	F: CAGTACTTTCAAACCGCAGAGA R: TGCTCTGGCCTGGTCATAG	53	259

Uzyskane produkty wizualizowano w 2% elektroforezie agarozowej, a następnie, w celu potwierdzenia poprawności sekwencji, poddawano reakcji sekwencjonowania. Produkt PCR uprzednio oczyszczano z żelu przy użyciu zestawu Gel-out zgodnie z zaleceniami producenta.

5.2.7. Technika ASA-PCR

Technikę ASA-PCR (ang. *Allele Specific Amplification Polymerase Chain Reaction*) wykorzystano do wykrywania wybranych mutacji w grupie kontrolnej. Oznaczeniu częstości występowania w populacji generalnej poddano zmiany: c.756+5C>T, c.749C>T (p.Pro250Leu), c.1052-2A>C, c.1094G>A (p.Arg365Gln) w genie *RAD50*, wariant genu *MRE11*: c.1475C>A (p.Ala492Asp) oraz c.506G>A (p.Arg169His) zidentyfikowany w genie *NBS1*. Badania grupy kontrolnej dla mutacji c.657_661del i p.Ile171Val w genie *NBS1* były wykonane w ramach wcześniejszych badań naukowych (rozdział 5.1.). Startery do reakcji zostały zaprojektowane w taki sposób, aby powielać allel zmutowany - jeden ze starterów był specyficzny do miejsca mutacji. W celu zminimalizowania prawdopodobieństwa łączenia się startera domutacyjnego z sekwencją prawidłową w starterze domutacyjnym zmieniono dodatkowo przedostatnią zasadę. Do sprawdzania poprawności reakcji, równocześnie ze starterem domutacyjnym, stosowany był starter tworzący dłuższy produkt kontrolny. Obecność tego produktu świadczyła o prawidłowo przeprowadzonej reakcji. Kontrolę pozytywną do każdej reakcji PCR stanowiła próbka DNA z potwierdzoną mutacją. W poniższych tabelach przedstawiono szczegółowy protokół reakcji ASA-PCR oraz sekwencje i temperatury przyłączania starterów (Tab. 16 - 18).

Tab. 16. Składniki mieszaniny reakcyjnej w reakcji ASA-PCR.

Składnik mieszaniny	Objętość/próbkę [μl]
Kapa Blood Direct	13
Startery [10mM]	0,5/0,5/0,5
woda	7

Tab. 17. Profil termiczny reakcji ASA-PCR.

Temp. (°C)*	Czas (min)	Liczba cykli
94	7,00	-
94	0,30	-
T _A *	0,45	35
72	0,45	-
72	7,00	-

*T_A(°C) – Temperatura przyłączania starterów. Spis temperatur dla poszczególnych reakcji ASA-PCR umieszczono w tabeli 18.

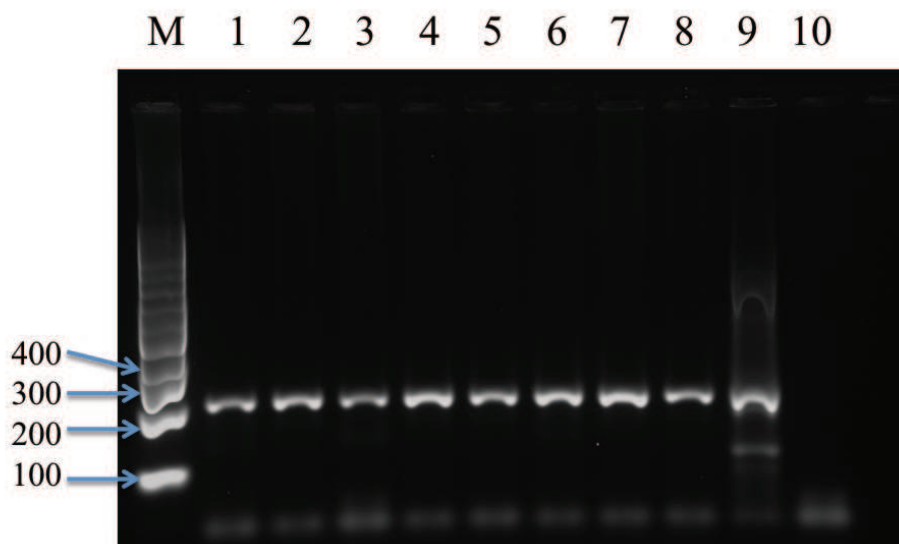
Tab. 18. Sekwencje starterów, temperatura przyłączenia starterów i długości oczekiwanych produktów w reakcji ASA-PCR.

Amplikon	Mutacja	Sekwencja starterów (5' -3')	*T _A (°C)	Długość produktu (pz)	
				Sekwencja bez mutacji	Sekwencja z mutacją
<i>RAD50</i>					
5	c.756+5C>T	<i>Forward</i> GGAAAAAGCTTGTGAGATTCCG <i>Reverse</i> TTGATTTAGCCAGTCCACGA <i>Aso</i> CTTGATCCATTGAAGGTAgT	54	205	114
5	c.749C>T (p.Pro250Leu)	<i>Forward</i> GGAAAAAGCTTGTGAGATTCCG <i>Reverse</i> TTGATTTAGCCAGTCCACGA <i>Aso</i> CCTATGAGAATGAACTTGATaT	54	359	264
8	c.1052-2A>G	<i>Forward</i> CGTGAATCTGCAGCTATCTCAA <i>Reverse</i> AATCTGTCTTTCAGTGAATGGTC <i>Aso (Reverse)</i> CTTGCAGCTGTAGACGACtC	63-56	200	130
8	c.1094G>A (p.Arg365Gln)	<i>Forward</i> CGTGAATCTGCAGCTATCTCAA <i>Reverse</i> ATGCCAAAATGGAGTCCAAC <i>Aso</i> CGCCATCAAGAACATATCtA	54	359	264
<i>MRE11</i>					
14	c.1475C>A (p.Ala492Asp)	<i>Forward</i> TTTGGTAATTTTCCTTGCTCATC <i>Reverse</i> TGAGAAAAACTAAACAAATCAGAGAG <i>Aso</i> GAACGTCATATTGATGtA	55	373	125
<i>NBS1</i>					
5	c.506G>A (p.Arg169His)	<i>Forward</i> GGATGTAAACAGCCTCTTTGTAGTT <i>Reverse</i> AAACAAGCATTAAAGAGGGAATTA <i>Aso</i> ATATTCTGGCTTTACAATTGGcT	55	238	121

*T_A(°C) – Temperatura przyłączenia starterów.

Ponieważ materiałem do badań grupy kontrolnej były wysuszone na bibule plamy krwi, do reakcji zastosowano mieszaninę Kapa Blood Direct pozwalającą na amplifikację wybranych sekwencji bez konieczności wcześniejszej izolacji DNA.

Produkty reakcji ASA-PCR rozdzielano na 2% żelu agarozowym w celu potwierdzenia specyficzności reakcji oraz zobrazowania krótszego produktu odpowiadającego allelowi z mutacją (Ryc. 7).



Ryc. 7. Przykładowy 2% żel agarozowy wybarwiony roztworem GelRed. Na żelu uwidoczono marker wielkości – M (wartości wyrażono w pz), zamplifikowany fragment eksonu piątego genu *RAD50* w próbkach kontrolnych (studzienki od 1-8) oraz w próbce z mutacją c.756+5C>T (nr 9). W próbce dziewiątej widoczny prążek odpowiadający prawidłowej długości produktu – 205 pz oraz krótszy produkt – 114 pz. Studzienka nr 10 – kontrola negatywna.

5.2.8. Narzędzia *in silico*

Potencjalny wpływ wybranych zmian eksonowych na proces wycinania intronów z pre-mRNA oraz na funkcjonowanie produktu białkowego określano za pomocą programu ALAMUT ([//interactive-biosoftware.com](http://interactive-biosoftware.com); wersja demo). Program ten łączy wartości uzyskane z algorytmów używanych przez platformy ESEfinder, SIFT, Mutation Taster. Programem ALAMUT posługiwano się również przy ocenie poziomu konserwatywności ulegających zamianie aminokwasów. Porównywano poziomy swoistości odpowiedników tych aminokwasów u szeregu gatunków (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Monodelphis domestica*, *Gallus gallus*). Ocenie poddawano zamieniany aminokwas, jak również sąsiednie, w pozycjach (-1), (+1). Dodatkowo badano swoistość nukleotydów ulegających substytucji w sekwencji konsensus. Potencjalny wpływ wybranych zmian eksonowych na białko określano również przy użyciu programu PolyPhen2 ([//genetics.bwh.harvard.edu/pph/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/)).

5.2.9. Nazewnictwo mutacji genów *MRE11*, *RAD50* i *NBS1*

Mutacje zapisywano zgodnie z najnowszymi zasadami dotyczącymi nomenklatury (<http://www.hgvs.org/mutnomen>).

5.2.10. Analiza statystyczna

Ocenę istotności statystycznej różnicy pomiędzy częstością występowania wybranych mutacji w grupie badanej oraz kontrolnej przeprowadzono przy zastosowaniu testu chi-kwadrat z poprawką Yatesa. Za próg istotności statystycznej przyjęto sugerowaną przez Houlston i Peto (2003) do analiz potencjalnych alleli niskiej penetracji wartość $p < 0,01$. Do opracowania wyników badań wykorzystano program STATISTICA for Windows 7.1 firmy StatSoft (Dobosz, 2004).

6. WYNIKI

Do analizy genów *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* zakwalifikowano 109 kobiet z silną rodzinną agregacją zachorowań na raki piersi i/lub jajnika. Kryteria kwalifikujące pacjentki do badania oraz charakterystykę grupy badanej przedstawiono w rozdziałach 5.1.1. i 5.1.2.

Przy użyciu techniki PCR amplifikowano eksony wraz z przylegającymi fragmentami intronów badanych genów, a następnie wykorzystywano technikę pośredniej identyfikacji mutacji – DHPLC. Próbkę, które wyróżniały się odmiennym chromatogramem, po ponownej amplifikacji, sekwencjonowano przy zastosowaniu starterów sensownego i antysensownego. Kolejnym etapem badań była bioinformatyczna analiza wybranych mutacji w celu określenia ich potencjalnego wpływu na funkcje białka i na proces składania mRNA. Zmiany wskazane przez program ESEfinder jako potencjalnie zaburzające proces wycinania intronów, klasyfikowano do badań na poziomie cDNA. Wyniki analizy poszczególnych genów zostały przedstawione w poniższych podrozdziałach.

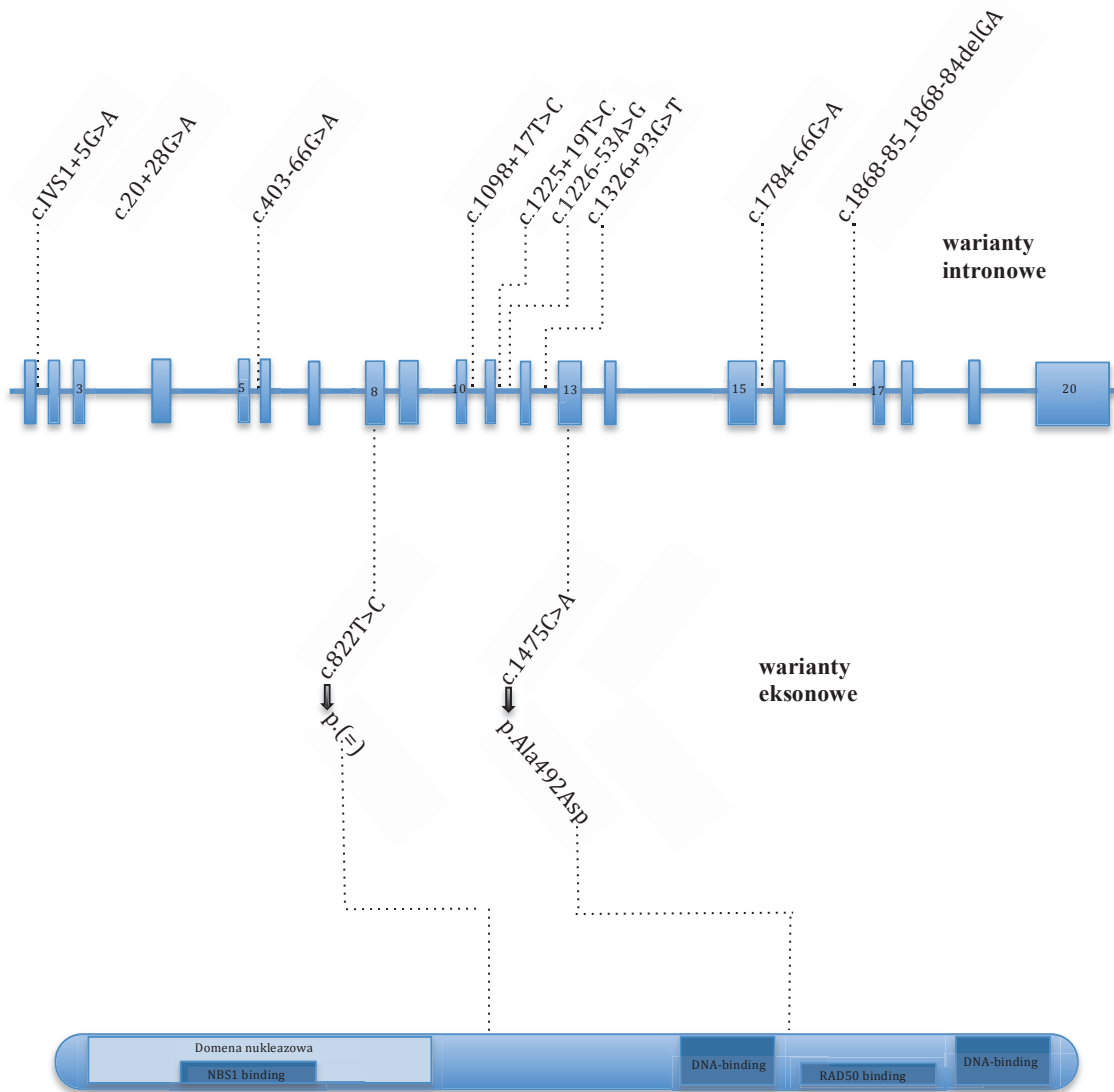
6.1. Analiza molekularna genu *MRE11*

W grupie 109 pacjentek obciążonych rodzinnym rakiem piersi i/lub jajnika zidentyfikowano 11 różnych wariantów sekwencyjnych genu *MRE11*. Dwie zaobserwowane zmiany zlokalizowane były w eksonach a pozostałe zidentyfikowano w częściach intronowych. Wszystkie wykryte zmiany były wcześniej odnotowane w bazach SNP i/lub literaturze. Poniżej przedstawiono lokalizację zidentyfikowanych wariantów w genie oraz białku MRE11 (Ryc. 8). Wykryte zmiany wraz z częstością występowania zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 19).

Tab. 19. Warianty sekwencyjne zidentyfikowane w genie *MRE11* w grupie 109 pacjentek z silną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

L.p.	Ekson/Intron	Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Rodzaj zmiany	Częstość wśród grupy badanej	Częstość wśród grupy kontrolnej
<i>Zmiany zlokalizowane w eksonach</i>						
1	8	c.822T>C	p.(=)	rs137868143	1,8% (2/109)	NB ¹
2	13	c.1475C>A	p.Ala492Asp	rs61749249	1,8% (2/109)	1/300 (0,3%)
<i>Zmiany zlokalizowane w intronach</i>						
3	1	c.-106+5G>A	-	rs1805363	7,3% (8/109)	NB
4	2	c.20+28G>A	-	rs497763	70,6 (77/109)	NB
5	5	c.403-6G>A	-	rs535801	39,4% (43/109)	NB
6	10	c.1098+17T>C	-	rs1805365	1,8% (2/109)	NB
7	11	c.1225+19T>C	-	rs641936	55,9% (61/109)	NB
8	11	c.1226-53A>G	-	rs115997947	0,9% (1/109)	NB
9	12	c.1326+93G>T	-	rs115203193	0,9% (1/109)	NB
10	15	c.1784-66G>A	-	rs1014666	39,4% (43/109)	NB
11	16	c.1868-85_1868-84delGA	-	rs13447714	13,7% (15/109)	NB

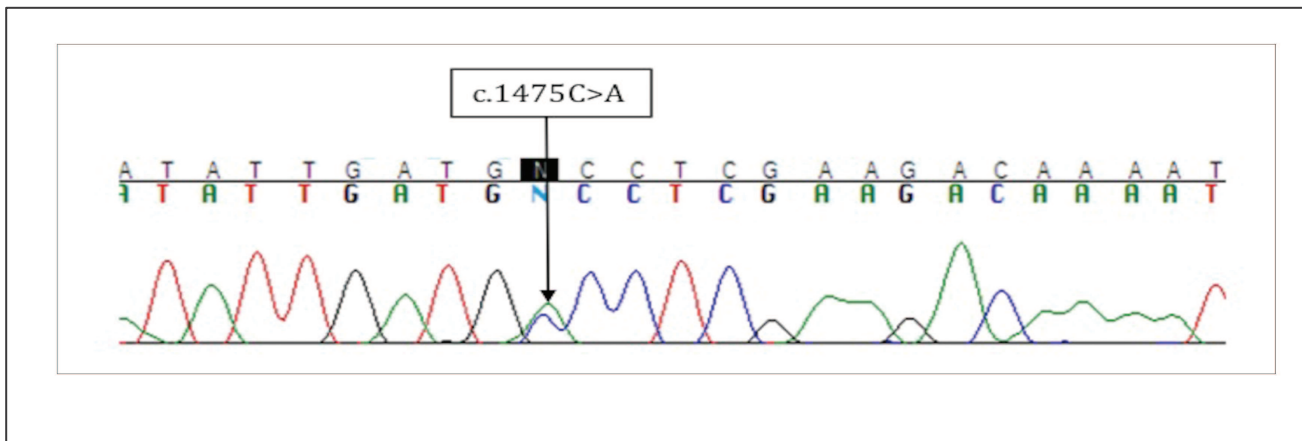
¹NB- nie badano



Ryc. 8. Schemat przedstawiający lokalizację zmian zidentyfikowanych w genie *MRE11* oraz ich umiejscowienie w produkcie białkowym.

Wykryte zmiany intronowe sklasyfikowano jako neutralne polimorfizmy genu *MRE11*. Wszystkie były dotąd opisane, a ich częstość występowania była zbliżona do częstości odnotowanej w bazach SNP oraz w innych doniesieniach. Najrzadziej występujące zmiany (c.1098+17T>C; c.1226-53A>G; c.1326+93G>T) zlokalizowane były w zbyt odległych częściach intronów, co uniemożliwiało miarodajne oszacowanie ich wpływu na *splicing* przy użyciu metod *in silico*. Z tego względu zostały one sklasyfikowane jako rzadkie polimorfizmy genu *MRE11* o nieznanym wpływie na białko. Ze względu na brak doniesień określających znaczenie biologiczne wykrytych zmian eksonowych, poddano je analizie *in silico*. Przy użyciu programów ALAMUT i SIFT oceniano wpływ zmiany *missense* (p.Ala492Asp) na strukturę i funkcje białka *MRE11*. Do oceny potencjalnego wpływu obu wariantów na składanie mRNA wykorzystano program ESEfinder. Wyniki tej analizy wskazały na zmiany w układzie sygnałów rozpoznawanych przez białka SR w obu przypadkach.

W genie *MRE11* wykryto jedną potencjalnie patogenną zmianę. W wyniku analizy eksonu 13 u dwóch pacjentek zidentyfikowany został wariant typu *missense*, p.Ala492Asp. Pacjentki nie były nosicielkami mutacji w *BRCA1/2*, natomiast u jednej z nich zidentyfikowano rzadką zmianę p.Arg365Gln w genie *RAD50* (Rodz. 6.2.). Probanka zachorowała na raka piersi w wieku 53 lat, z kolei w wieku lat 63 wystąpił u niej nowotwór trzustki. U matki probantki zdiagnozowano raka piersi w wieku 38 lat. Z historii rodziny wynika, że babcia pacjentki zmarła na nowotwór narządów rodnych (brak danych dotyczących dokładniej lokalizacji nowotworu i wieku zachorowania). U drugiej pacjentki wystąpił rak szyjki macicy, jajnika oraz piersi odpowiednio w wieku 30, 35 i 49 lat. U siostry matki probantki wykryto raka piersi, w rodzinie zanotowano dodatkowo zachorowania na raka wątroby i gruczolakoraka nadnerczy. Zmiana p.Arg365Gln znajduje się w rejonie konserwowanym ewolucyjnie u kręgowców, zarówno arginina, jak i sąsiadujące z nią aminokwasy, wykazują silną swoistość dla danego miejsca w szeregu aminokwasów. Program ALAMUT wskazał zmianę jako tolerowalną przez komórkę, jednak PolyPhen2 wykazał jej potencjalnie patogenny wpływ na białko MRE11. Zmiana została zidentyfikowana w grupie kontrolnej. Różnica częstości występowania tej zmiany w porównaniu z grupą badaną nie była istotna statystycznie ($p=0,7$). Program ESEfinder wskazał miejsce w obrębie substytucji jako swoiste dla białek SF2/ASF, które w konsekwencji mutacji jest tracone i zastępowane innym, swoistym dla białka SC35 (Tab. 22). Analiza cDNA nie potwierdziła jednak zaburzania *splicingu*. Na ryc. 9 przedstawiono elektroforogram próbki z opisywaną mutacją.



Ryc. 9. Elektroforogram uzyskany metodą sekwencjonowania dla próbki z mutacją c.1475C>A (p.Ala492Asp) w genie *MRE11*.

Druga zmiana eksonowa, c.822C>T, wykryta została u dwóch pacjentek. Zmiana zlokalizowana jest w eksonie ósmym genu *MRE11* i nie powoduje substytucji aminokwasowej. Zgodnie z ESEfinder zamiana T > C powoduje utworzenie dodatkowego sygnału rozpoznawalnego przez białka SR, przy jednoczesnym zachowaniu istniejącego. Odnotowana jest w bazach SNP jako polimorfizm genu *MRE11* i z uwagi na brak przesłanek dotyczących jej potencjalnej patogenności nie została poddana dalszym analizom oraz ocenie częstości występowania w grupie kontrolnej.

6.2. Warianty sekwencyjne wykryte w genie *RAD50*

W genie *RAD50* wykryto siedem zmian sekwencyjnych, z których trzy nie były dotąd opisane. W obrębie eksonów zidentyfikowano dwa warianty, pozostałych pięć zaobserwowano w intronach. Lokalizację wykrytych zmian przedstawiono poniżej (Ryc. 10.). Zestawienie wszystkich wariantów zawarto w tab. 20.

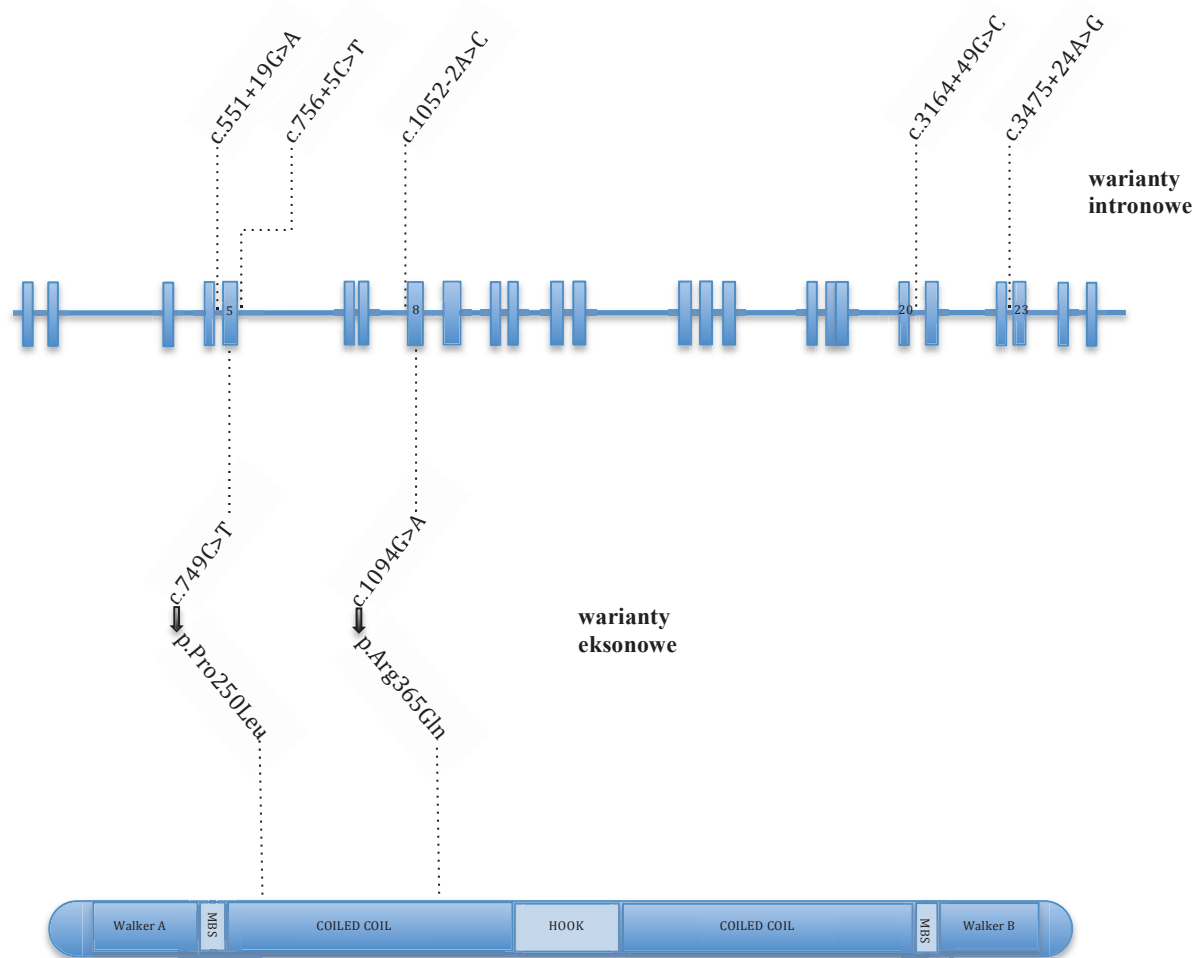
Trzy spośród pięciu wariantów intronowych to znane i częste polimorfizmy genu *RAD50*. Wobec braku przesłanek dotyczących ich potencjalnego znaczenia w rozwoju nowotworu piersi i/lub jajnika nie zostały one objęte dodatkowymi badaniami. Dwie mutacje wykryte w częściach kodujących były substytucjami typu *missense*. Jedna ze zmian jest nowa (p.Pro250Leu), druga, p.Arg365Gln, została wcześniej odnotowana w bazach SNP, lecz jej znaczenie biologiczne nie zostało określone. Obie warianty poddano analizie przy użyciu programów komputerowych przewidujących potencjalny wpływ mutacji na białko. Dodatkowo oceniono częstość ich występowania w populacji generalnej. Na podstawie wyników analiz *in silico* zmianę p.Pro250Leu sklasyfikowano, jako potencjalnie uszkadzającą funkcje białka. Do dalszych badań na poziomie cDNA skierowano, przez wzgląd na ich lokalizację, dwie zmiany intronowe, c.756+5C>T i c.1052-2A>C oraz mutację p.Arg365Gln, której potencjalny wpływ na *splicing* wskazany został przez program ESEfinder. Wartości uzyskane na podstawie analiz bioinformatycznych dla zmian eksonowych w genie *RAD50* przedstawiono w tab. 22.

Tab. 20. Warianty sekwencyjne zidentyfikowane w genie *RAD50* w grupie 109 pacjentek z silną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

L.p.	Ekson/Intron	Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Rodzaj zmiany	Częstość wśród grupy badanej	Częstość wśród grupy kontrolnej
<i>Zmiany zlokalizowane w eksonach</i>						
1	5	c.749C>T	p.Pro250Leu	nowa ¹	0,9% (1/109)	0/300
2	8	c.1094G>A	p.Arg365Gln	rs146370443	0,9% (1/109)	0,3% (1/300)
<i>Zmiany zlokalizowane w intronach</i>						
3	4	c.551+19G>A	-	rs17166050	48,6% (53/109)	NB ²
4	5	c.756+5C>T	-	nowa	0,9% (1/109)	0/300
5	7	c.1052-2A>C	-	nowa	0,9% (1/109)	0/300
6	20	c.3164+49G>C	-	rs143829407	3,6% (4/109)	NB
7	22	c.3475+24A>G	-	rs137906075	6,4% (7/109)	NB

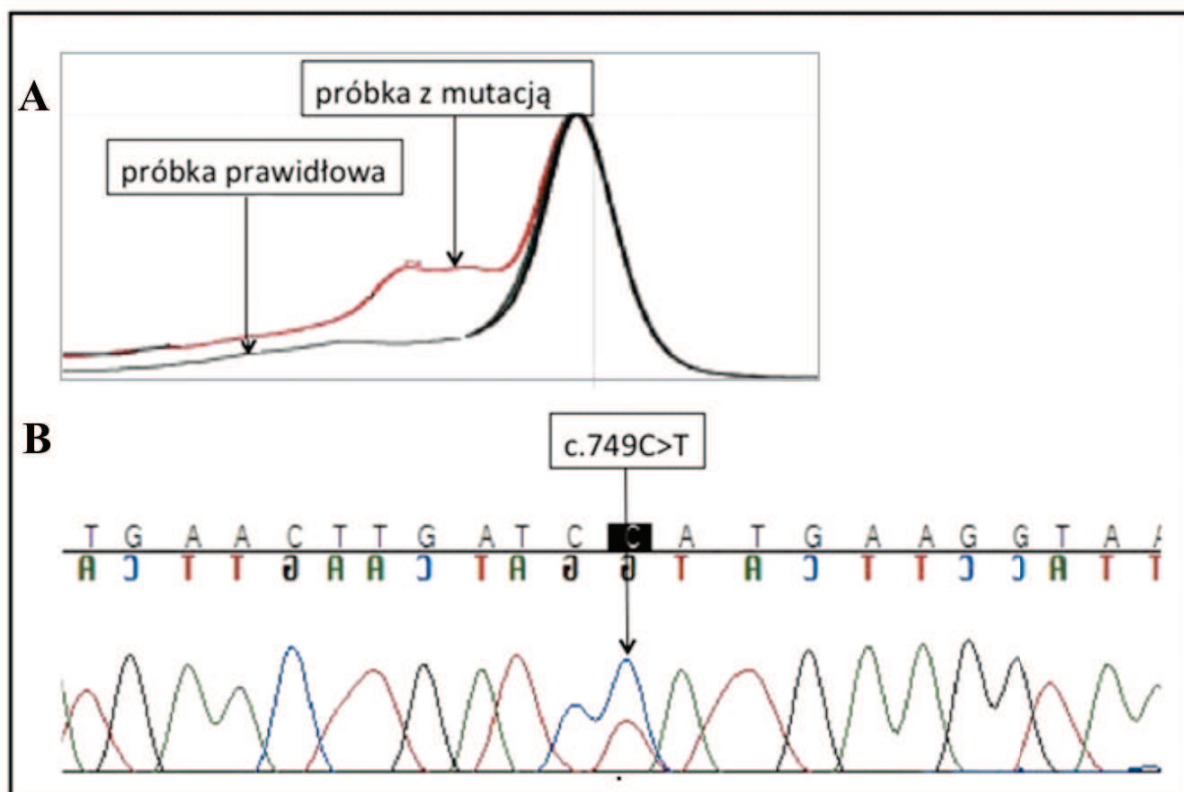
¹ nowa – zmiana dotychczas nieopisana i nieodnotowana w bazach SNP

² NB – nie badano



Ryc. 10. Schemat przedstawiający lokalizację zmian zidentyfikowanych w genie *RAD50* oraz ich umiejscowienie w produkcie białkowym. MBS: *MRE11 binding sites*.

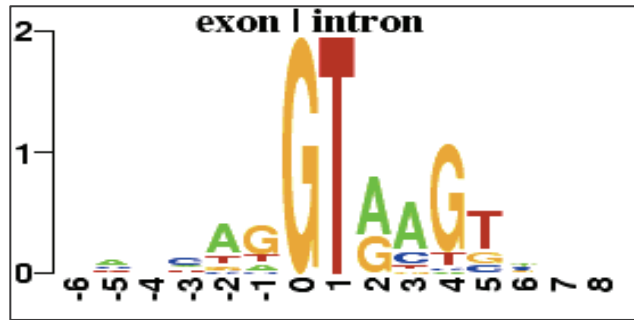
Zmiana p.Pro250Leu (c.749C>T) zlokalizowana jest w eksonie piątym genu *RAD50* kodującym fragment jednego z dwóch ramion *coiled-coil*. Skutkuje zamianą dwóch biochemicznie różnych aminokwasów, proliny na leucynę. Mutacja została zidentyfikowana u jednej pacjentki i nie była wcześniej zarejestrowana w bazach danych ani opisana w literaturze. Pacjentka zachorowała na raka piersi w wieku 48 lat, a jej matka w wieku lat 43. W rodzinie wystąpił dodatkowo przypadek zachorowania na raka płuca. Pacjentka nie jest nosicielką mutacji w genach *BRCA1/BRCA2*. W tym przypadku nie było możliwości przeprowadzenia badań kosegregacyjnych wśród krewnych pacjentki. Poniżej przedstawiono chromato- i elektroforogram próbki, w której zidentyfikowano omawiany wariant (Ryc. 11).



Ryc. 11. Wynik analizy eksonu piątego genu *RAD50*. A) wynik analizy DHPLC dla próbki z mutacją c.749C>T; B) wynik sekwencjonowania eksonu piątego uwidaczniający substytucję cytozyny na tyminę.

W celu określenia możliwego efektu biologicznego wykrytej mutacji przeprowadzono analizę *in silico*. Uzyskane wartości przy użyciu programu PolyPhen2 świadczą o wysoce prawdopodobnym patogennym wpływie opisywanej mutacji na strukturę i funkcję białka RAD50. Zgodnie z algorytmem stosowanym przez program ALAMUT prawdopodobieństwo zaburzenia funkcji białka jest również wysokie. Wynik porównania sekwencji ośmiu ortologów wskazuje zarówno utraconą prolinę, jak i sąsiadujące z nią aminokwasy jako silnie konserwowane, co wzmacnia hipotezę o patogennym charakterze zmiany. Program ESEfinder nie wykazał istnienia w pozycji 749 genu *RAD50* miejsca donorowego bądź akceptorowego rozpoznawalnego przez białka z rodziny SR wskazując na prawdopodobny brak wpływu opisywanej mutacji na proces usuwania intronów (Tab. 22). Zmiany nie zidentyfikowano w grupie 300 próbek kontrolnych. Różnica w częstotliwości występowania w porównaniu z grupą badaną nie była istotna statystycznie ($p=0,5$).

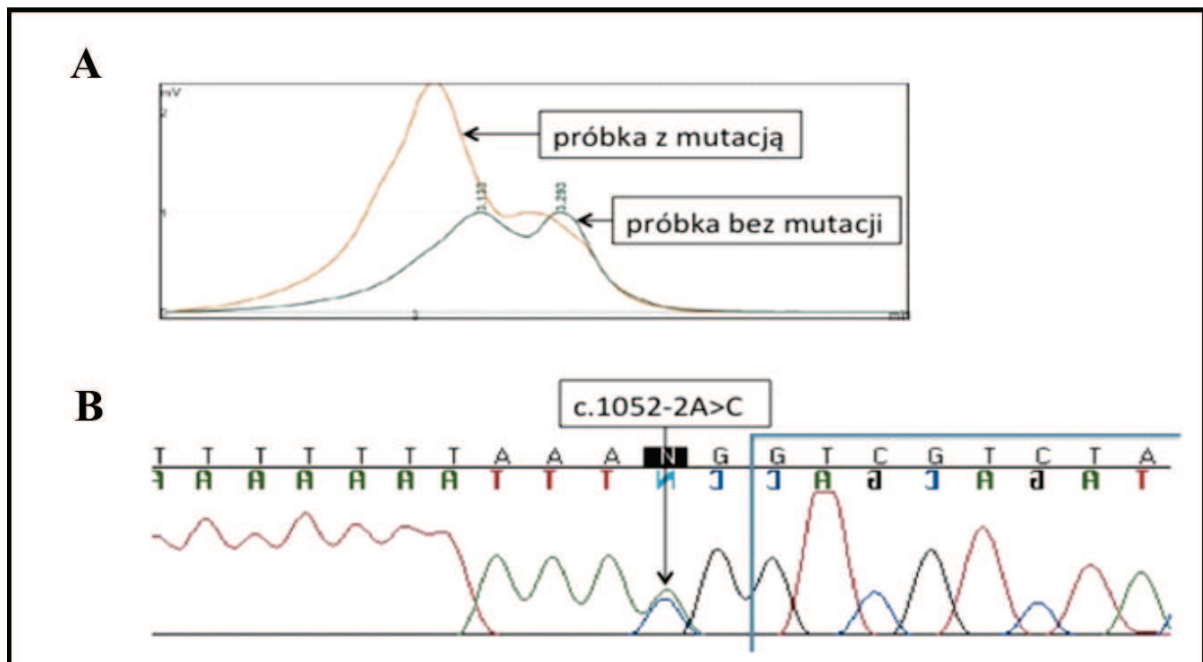
U jednej pacjentki wykryto kolejną zmianę, 756+5C>T, w intronie piątym. Polegała ona na substytucji cytozyny na tyminę i zachodziła w miejscu donorowym +5 od końca eksonu piątego. Zmiana nie była wcześniej opisywana w literaturze, nie jest również zarejestrowana w bazach danych. Przeprowadzone badania w grupie kontrolnej nie doprowadziły do identyfikacji wspomnianej mutacji w żadnej z 300 próbek. Wynik nie był istotny statystycznie ($p=0,5$). Pacjentka zachorowała na raka piersi w wieku 35 lat. W rodzinie ojca pacjentki wystąpiły dwa nowotwory, rak piersi u babci probantki (wiek diagnozy 72 lata) oraz nowotwór o nieznanym punkcie wyjścia u brata ojca. Probantka dodatkowo jest nosicielką mutacji w genie *BRCA2* (c.3860delA). Badania kosegregacyjne wykonane u zdrowej córki pacjentki wykazały obecność mutacji c.756+5C>T w genie *RAD50* i brak nosicielstwa mutacji w genie *BRCA2*. Lokalizacja mutacji w bliskiej odległości od granicy ekson/intron sugerowała potencjalną możliwość zaburzenia procesu składania mRNA. Poniżej przedstawiono udział nukleotydów w pozycji +5 od granicy ekson/intron (Ryc. 12).



Ryc. 12. Udział poszczególnych nukleotydów w sekwencji konsensusu w miejscu donorowym dla białek procesu składania mRNA. Wysokość każdej litery odzwierciedla częstość występowania nukleotydu w danym miejscu sugerując tym samym niski poziom konserwatywności cytozyny w miejscu +5.

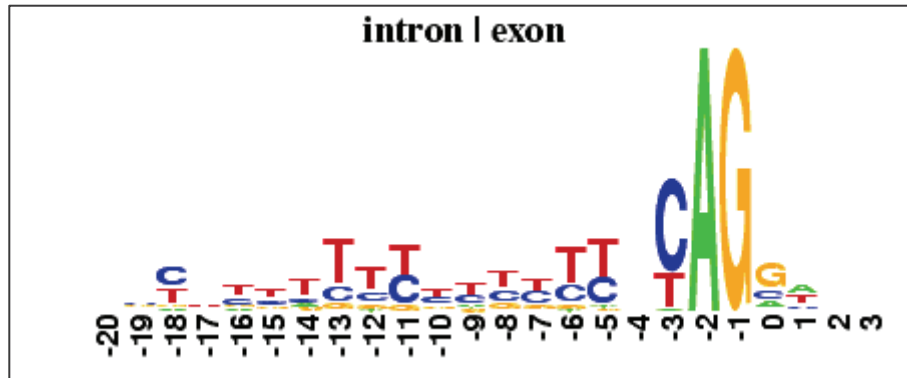
Reakcja PCR z wykorzystaniem matrycy cDNA nie wykazała obecności krótszego produktu, który świadczyłby o zaburzonej *splicingu*. Wyniki tych analiz wskazują na prawdopodobny neutralny charakter zmiany i klasyfikują ją w grupie polimorfizmów genu *RAD50*.

W wyniku analizy eksonu ósmego genu *RAD50* u jednej ze 109 pacjentek zidentyfikowano nową zmianę c.1052-2A>C znajdującą się w intronie siódmym. W rodzinie pacjentki występowała agregacja zachorowań na raka piersi. U samej probantki zdiagnozowano obustronny raka piersi odpowiednio w wieku 43 i 53 lat, u jej matki przed 40 r. ż. Dodatkowo w rodzinie występowały inne nowotwory, w tym rak żołądka. Pacjentka nie jest nosicielką mutacji w genach o wysokiej penetracji *BRCA1/2*. W tym przypadku nie było możliwości przeprowadzenia badań kosegregacyjnych w rodzinie pacjentki. Badania grupy kontrolnej nie wykazały obecności tej mutacji w żadnej z 300 próbek, różnica w częstości występowania w porównaniu z grupą badaną nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0,5$). Poniżej przedstawiono wynik analizy DHPLC oraz sekwencjonowania dla próbki z omawianą mutacją (Ryc. 13).



Ryc. 13. Wynik analizy amplikonu zawierającego fragment intronu siódmego genu *RAD50* przedstawiający mutację c.1052A>C. A) wynik analizy DHPLC B) wynik sekwencjonowania uwidaczniający substytucję adeniny na cytozynę. Niebieska linia wskazuje początek eksonu.

Adenina w pozycji -2 jest stałym nukleotydem wchodzącym w skład sekwencji konsensus w miejscu akceptorowym dla białek biorących udział w procesie składania mRNA. Teoretycznie zmiana w tym miejscu zaburza ten proces powodując całkowitą utratę miejsca akceptorowego 3'. Układ nukleotydów w sekwencji konsensus przedstawiono poniżej (Ryc. 14).



Ryc. 14. Udział nukleotydów w sekwencji konsensus w miejscu akceptorowym dla białek biorących udział w procesie składania mRNA. Wysokość każdej litery odzwierciedla częstość występowania nukleotydu w danym miejscu, sugerując tym samym silną konserwatywność adeniny w miejscu -2.

W celu oceny wpływu opisywanej mutacji na proces składania mRNA przeprowadzono analizę na poziomie cDNA. Reakcja PCR z zastosowaniem starterów zakotwiczonych w eksonie szóstym i dziewiątym genu *RAD50* nie wykazała obecności krótszego produktu świadczącego o nieprawidłowym *splicingu*. Prawidłowość transkryptu została dodatkowo potwierdzona sekwencjonowaniem.

Znany, rzadki wariant c.1094G>A (p.Arg365Gln) został zidentyfikowany w eksonie ósmym u jednej z pacjentek, u której dodatkowo zabserwowano mutację w genie *MRE11*: p.Ala492Asp. Badaniem kosegregacyjnym objęto zdrową córkę, u której potwierdzono nosicielstwo zmiany c.1094G>A w *RAD50*. Zarówno u probantki, jak i córki, wykluczono nosicielstwo mutacji w *BRCA1* lub *BRCA2*. Mutacja c.1094G>A została wykryta w jednej z 300 próbek kontrolnych (0,33%). Zmiana c.1094G>A występuje w bazach danych jako polimorfizm o łagodnym wpływie na białko. Wskazują na to wartości analiz bioinformatycznych PolyPhen2 oraz ALAMUT. Porównanie sekwencji ortologów potwierdziło ten wynik wskazując, że miejsce zajścia substytucji i jej okolice charakteryzuje się niską swoistością. Dane uzyskane przy użyciu programu ESEfinder wskazały na utratę miejsca rozpoznawalnego przez białko SF2/ASF sugerując wpływ zmiany na proces składania mRNA (Tab. 22). W oparciu o te przewidywania przeprowadzono badania na poziomie cDNA. Uwidoczniony w procesie elektroforezy poliakrylamidowej pojedynczy prążek będący na wysokości prawidłowego produktu (467pz) świadczył o braku wpływu c.1094G>A na *splicing*.

6.3. Spektrum mutacji w genie *NBS1* w grupie 109 pacjentek z dziedzicznym rakiem piersi

Analiza molekularna genu *NBS1* wykazała obecność 15 różnych wariantów sekwencyjnych. W częściach intronowych zidentyfikowano osiem zmian, a we fragmentach kodujących siedem: sześć substytucji nukleotydowych oraz delecję. Wśród zmian eksonowych wykryto trzy rzadkie warianty: dwa zostały wcześniej opisane w literaturze jako mutacje zwiększające ryzyko zachorowania na raka piersi i/lub jajnika (p.Ile171Val; c.657_661del) oraz jeden nowy (p.Arg169His). Pozostałe warianty występujące w częściach kodujących to znane, neutralne polimorfizmy genu *NBS1*. Częstość ich występowania w badanej grupie była zbliżona do częstości obserwowanej w innych doniesieniach oraz bazach SNP, dlatego nie zostały one objęte dodatkowymi badaniami. Spośród ośmiu wariantów wykrytych w intronach, trzy były nowe. Ze względu na lokalizację w głębokich częściach intronu, ich wpływ na białko nie był możliwy do oszacowania. Pozostałe warianty zidentyfikowane w intronach to znane neutralne polimorfizmy. Ryc. 15 przedstawia lokalizację zmian intronowych i eksonowych w genie oraz miejsca występowania wariantów eksonowych w białku. Wykryte zmiany zestawiono w tab. 21.

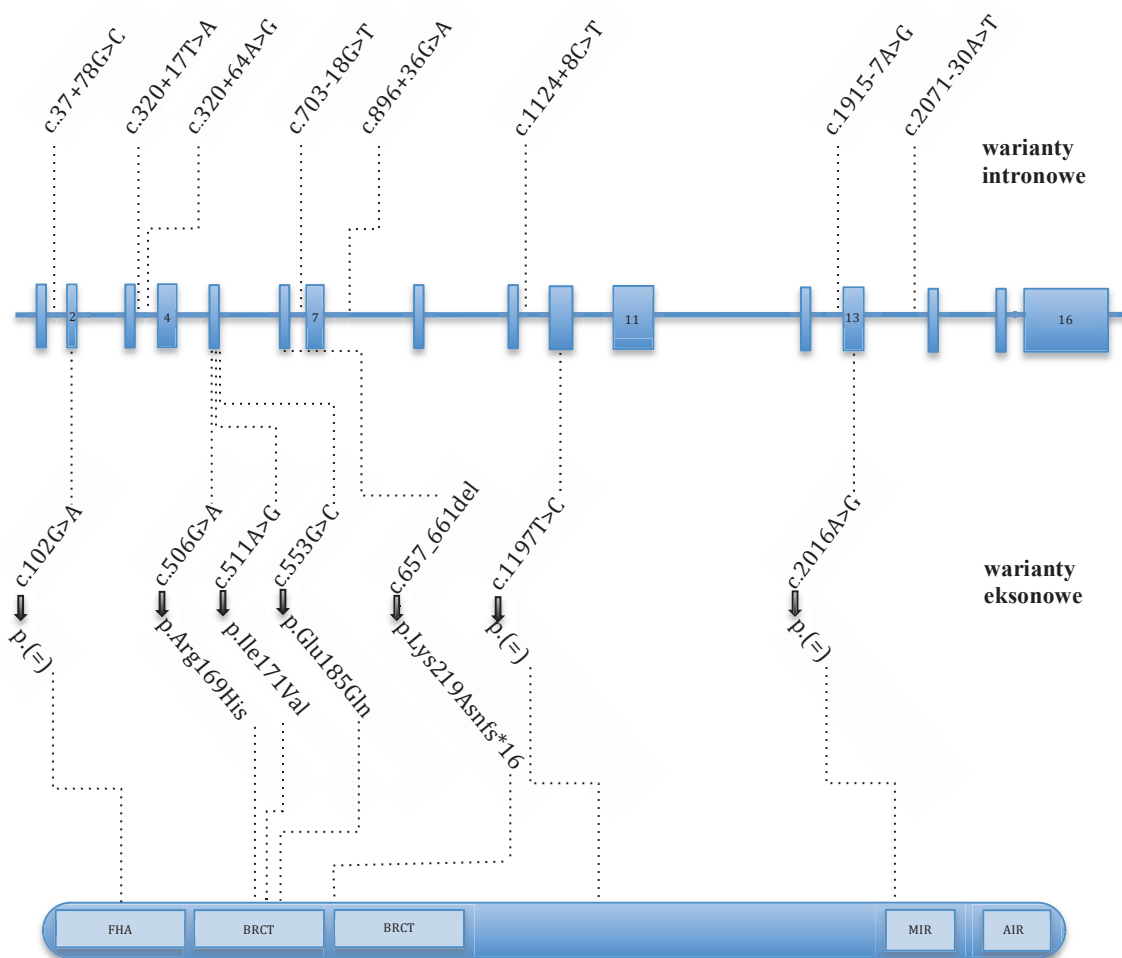
Tab. 21. Warianty sekwencyjne zidentyfikowane w genie *NBS1* w grupie 109 pacjentek z silną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

L.p.	Ekson/ Intron	Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Rodzaj zmiany	Częstość wśród grupy badanej	Częstość wśród grupy kontrolnej
<i>Zmiany zlokalizowane w eksonach</i>						
1	2	c.102G>A	p.(=)	rs1063045	59,6% (65/109)	NB ²
2	5	c.506G>A	p.Arg169His	nowa ³	0,9% (1/109)	0/300
3	5	c.511A>G	p.Ile171Val	rs61754966	0,9% (1/109)	1,3% ¹ (10/754)
4	5	c.553G>C	p.Glu185Gln	rs1805794	47,7% (52/109)	NB
5	6	c.657_661del	p.Lys219Asnfs*16	cd982819	0,9% (1/109)	0,41 ¹ (10/2399)
6	10	c.1197T>C	p.(=)	rs709816	39,4% (43/109)	NB
7	13	c.2016A>G	p.(=)	rs1061302	60,5% (66/109)	NB
<i>Zmiany zlokalizowane w intronach</i>						
8	1	c.37+78G>C	-	nowa	0,9% (1/109)	NB
9	3	c.320+17T>A	-	nowa	0,9% (1/109)	NB
10	3	c.320+64A>G	-	nowa	6,4% (7/109)	NB
11	6	c.703-18G>T	-	rs769418	3,6% (4/109)	NB
12	7	c.896+36G>A	-	rs1805826	1,8% (2/109)	NB
13	9	c.1124+18C>T	-	rs2234744	54,1% (59/109)	NB
14	12	c.1915-7A>G	-	rs2308962	60,5% (66/109)	NB
15	13	c.2071-30A>T	-	rs3736639	54,1% (59/109)	NB

¹ wyniki dla grupy kontrolnej pochodzą z badań przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki GUMed, opisanych w 2010 r. (Kanka i in.)

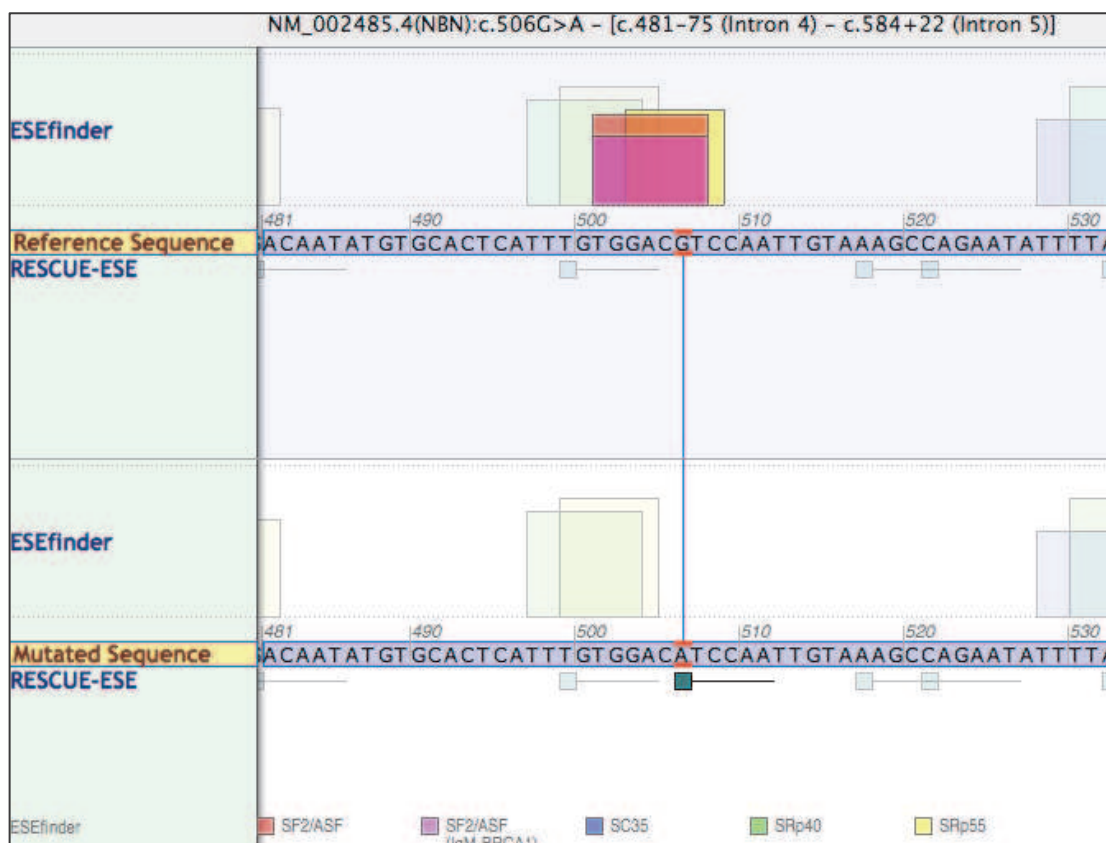
² NB- nie badano

³ nowa - zmiana dotychczas nieopisana i nieodnotowana w bazach SNP



Ryc. 15. Schemat przedstawiający lokalizację zmian zidentyfikowanych w genie *NBS1* oraz ich umiejscowienie w produkcie białkowym. Domeny: FHA (ang. *forkhead-associated domain*), BRCT (ang. *BRCA1 C-terminal domain*), MIR (*MRE11 interacting region*), AIR (*ATM interacting region*).

Jedyną nową zmianą eksonową zidentyfikowaną w genie *NBS1* była zlokalizowana w eksonie piątym zmiana typu *missense*, 506G>A (p.Arg169His). U pacjentki zdiagnozowano raka piersi w wieku 48 lat, u jej matki w wieku lat 82. W rodzinie pacjentki dodatkowo wystąpiły trzy przypadki zachorowań na raka żołądka (u siostry pacjentki, jej ojca oraz jego brata). Wspomniana mutacja powoduje wstawienie histydyny w miejsce argininy w pozycji 169 białka *NBS1*. Zlokalizowana jest w obrębie ważnej, silnie konserwowanej domeny BRCT. Porównanie sekwencji odpowiedników nibryny ośmiu kręgowców wskazało miejsce zamiany reszt aminokwasowych jako silnie swoiste dla argininy. Dodatkowo oba aminokwasy sąsiadujące z arginina są silnie konserwowane ewolucyjnie. Wartości uzyskane przez program ALAMUT wskazują na potencjalnie uszkodzający wpływ opisywanej zmiany na strukturę i funkcje białka, jednakże, zgodnie z algorytmem używanym przez program PolyPhen2, mutacja jest łagodna i prawdopodobnie nie wpływa na funkcjonowanie białka. W celu określenia ewentualnego efektu tej mutacji na proces składania mRNA, zmianę analizowano przy użyciu programu ESEfinder. Wartości uzyskane z tych analiz przedstawiono w tab. 22. Wyniki wykazały, że zamiana guaniny na alaninę powoduje utratę miejsca rozpoznawanego przez białka SRp55 oraz SF2/ASF. Obraz zachodzących zmian przedstawiony został poniżej (Ryc. 16).



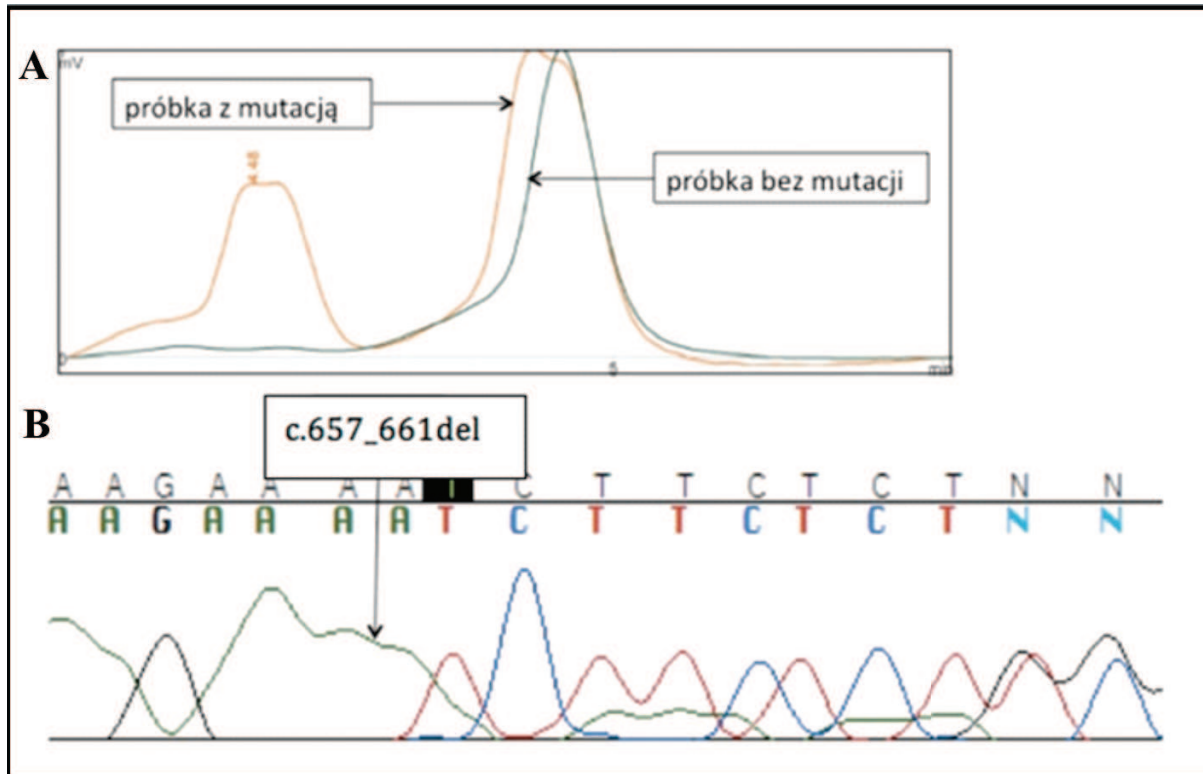
Ryc. 16. Zestawienie wyników analizy miejsc ESE w obrębie sekwencji z mutacją c.506G>A. Górna sekwencja to sekwencja referencyjna, dolna to sekwencja z mutacją. Po zajściu substytucji c.506G>A zanika miejsce rozpoznawalne przez białka SF2/ASF oraz SR55. Wynik generowany przy użyciu programu ALAMUT.

Zmiana została zakwalifikowana do dalszych badań na poziomie cDNA, jednakże, w związku z brakiem możliwości pobrania próbki krwi od pacjentki, jak również od jej krewnych, nie było możliwości przeprowadzenia tych analiz. Mutacji nie zidentyfikowano w żadnej z 300 próbek kontrolnych. Analiza porównawcza częstości występowania mutacji w grupie badanej (1/109; 0,9%) i kontrolnej nie wykazała istotnie statystycznych różnic ($p=0,5$).

Mutację c.511A>G (p.Ile171Val) zidentyfikowano u jednej ze 109 pacjentek. Probandka zachorowała na raka piersi w wieku 37 lat, nowotwór ten wystąpił również u jej siostry. Z powodu braku możliwości uzyskania DNA od członków rodziny probantki nie przeprowadzono badań kosegregacyjnych. Substytucja A > G w pozycji 511 genu *NBS1* jest mutacją znaną, związaną z predyspozycją do rozwoju raka piersi. Zlokalizowana jest w eksonie piątym w obrębie silnie konserwowanego rejonu kodującego domenę BRCT. Mutacja skutkuje zamianą aminokwasu o wysokiej swoistości. Badania grupy kontrolnej składającej się z 754 próbek doprowadziły do identyfikacji tej zmiany w dziesięciu próbkach (1,32%). Różnica w częstości występowania p.Ile171Val w grupie badanej (1/109; 0,9%) i kontrolnej nie była istotna statystycznie ($p=0,8$).

W wyniku analizy sekwencji eksonu szóstego genu *NBS1* u jednej ze 109 pacjentek wykazano obecność delekcji pięciu par zasad (ACAAA) w pozycji 657 (c.657_661del). Mutacja powoduje translację dwóch skróconych łańcuchów białkowych z zachowanymi jedynie częściowymi funkcjami prawidłowej nibryny. Heterozygotyczne nosicielstwo mutacji c.657_661del związane jest z trzykrotnym wzrostem ryzyka zachorowania na raka piersi. U probantki zdiagnozowano raka piersi w wieku 68 lat, u jej siostry w wieku lat 63. Pacjentka nie jest nosicielką mutacji w genach *BRCA1/2*. W rodzinie pacjentki występowały również zachorowania na nowotwór żołądka oraz jelita grubego. W przypadku tej rodziny nie było możliwości przeprowadzenia badań kosegregacyjnych. Mutację c.657_661del zidentyfikowano w dziesięciu z 2399 anonimowych próbek krwi pochodzących od noworodków z województwa pomorskiego (0,41%), różnica w porównaniu z grupą badaną nie była

istotna statystycznie ($p=0,9$). Poniżej przedstawiono chromato- i elektroforogram próbki, w której zidentyfikowano zmianę c.657_661del (Ryc. 17).



Ryc. 17. Wynik analizy eksonu szóstego genu *NBS1*. A) wynik analizy DHPLC dla ampliconu szóstego
 B) wynik sekwencjonowania eksonu szóstego uwidaczniający delecję pięciu par nukleotydów.
 Strzałka wskazuje na miejsce początku delecji.

Tab. 22. Zestawienie wyników uzyskanych z baz ESE Finder, PolyPhen2, SIFT wraz z poziomem konserwatywności aminokwasów dla mutacji eksonowych zidentyfikowanych w genach *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* wśród pacjetek z rodzinnie występującym nowotworem piersi i/lub jajnika.

Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	ESEfinder	PolyPhen2*	Poziom Konserwatywności **	SIFT***
<i>MRE11</i>					
c.822T>C	p.(=)	Brak wpływu na istniejące MP ¹ dla SC35; Utworzenie nowego MP dla SRp40, SF2/ASF	-	(7/8; 8/8; 8/8)	-
c.1475C>A	p.Ala492Asp	Utrata MP dla SF2/ASF utworzenie nowego MP dla SC35	0,973	(8/8; 8/8; 7/8)	0,11
<i>RAD50</i>					
c.749C>T	p.Pro250Leu	Brak MP	0,996	(6/8; 8/8; 8/8)	0,05
c.1094G>A	p.Arg365Gln	Utrata MP dla SF2/ASF	0,013	7/8; 6/8; 7/8	0,33
<i>NBS1</i>					
c.506G>A	p.Arg169His	Utrata MP dla SF2/ASF, SRp55	0,214	(8/8; 8/8; 8/8)	0,02
c.511A>G	p.Ile171Val	Brak MP	0,999	(8/8; 8/8; 7/8)	0,00
c.657_661del	p.Lys219Asnfs*16	Skrócenie białka			

¹MP miejsce przyłączenia białek z rodziny SR

* im wartość współczynnika jest bliższa 1 tym większe prawdopodobieństwo zaburzenia funkcji białka

** porównanie poziomu konserwatywności aminokwasów w pozycjach -1; 0; +1 pośród ośmiu gatunków (*Homo sapiens*, *Pan tryglodytes*, *Macaca mulatta*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Monodelphis domestica*, *Gallus gallus*)

*** wartość współczynnika mniejsza od 0,05 sugeruje negatywny wpływ mutacji na białko

7. DYSKUSJA

7.1. Mutacje w genie *NBS1* są związane z podatnością na nowotwory piersi i/lub jajnika

Jak dotąd, spośród genów kodujących kompleks MRN, najszerzej zbadany został gen *NBS1*. Związek pomiędzy nosicielstwem heterozygotycznych mutacji w tym genie, a podwyższonym ryzykiem rozwoju nowotworów został po raz pierwszy zasugerowany na podstawie wyników badań krewnych pacjentów z zespołem Nijmegen (Seemanova, 1990). Homozygotyczna postać mutacji c.657_661del, występującej u 90% pacjentów z tym zespołem, prowadzi do translacji dwóch skróconych łańcuchów białkowych wykazujących jedynie częściowe funkcje prawidłowej nibryny. Krótki N-terminalny produkt z zachowanymi domenami FHA/BRCT ulega interakcjom z MDC1, natomiast białko z zachowanym końcem C-terminalnym posiada zdolność do oddziaływania z MRE11. Niewiele wiadomo, jaki efekt wywołuje heterozygotyczna forma tej delecji. Zgodnie z najnowszymi wynikami badań, jej obecność nie wpływa na istotne funkcje nibryny, jednakże na skutek działania promieniowania jonizującego obserwowane jest zwiększenie częstości spontanicznych pęknięć nici DNA. Sugeruje się, że heterozygotyczna forma mutacji c.657_661del może mieć wpływ na kancerogenezę (Dzikiewicz-Krawczyk i in., 2012).

W 2004 roku polski ośrodek przeprowadził badania określające udział heterozygotycznej postaci mutacji słowiańskiej w etiologii różnych typów nowotworów (Steffen i in., 2004). Wyraźnie zwiększoną częstość allele c.657_661del w stosunku do grupy kontrolnej zaobserwowano wśród chorych z czerniakiem złośliwym oraz chłoniakiem nieziarniczym (*non-Hodgkin lymphoma*, NHL). Nosiciele znaleziono również wśród chorych na raka jelita grubego oraz piersi. W innej pracy badaniom poddano krewnych pacjentów z zespołem Nijmegen (Seemanova i in., 2007). Wyniki wskazały, że wyraźnie większą grupę nosicieli stanowili krewni chorzy na raka w odróżnieniu od krewnych bez historii nowotworowej. Na tej podstawie autorzy wskazali na związek mutacji słowiańskiej ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworu. Korelację nosicielstwa tej mutacji z rozwojem nowotworu zaobserwowano również w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej, chłoniaka nieziarniczego, czerniaka złośliwego, prostaty i jajnika (Chrzanowska i in., 2006; Cybulski i in., 2004a; Steffen i in., 2004).

Celem badań szeregu zespołów stała się również próba określenia udziału mutacji c.657_661del w rozwoju nowotworu piersi. Wyniki badań Górskiego i wsp. (2003) jako pierwsze wskazały na wpływ nosicielstwa mutacji słowiańskiej na rozwój tego nowotworu. W grupie składającej się ze 150 pacjentek z wtórnym rakiem piersi (<50 r. ż) oraz 80 z rakiem o podłożu dziedzicznym częstość mutacji wynosiła odpowiednio 1,3% i 3,75%. W grupie kontrolnej, stanowiącej 530 zdrowych kobiet, zmianę zidentyfikowano w 0,6%. Autorzy pracy zasugerowali, że wysoka częstość mutacji słowiańskiej w grupach badanych oraz znamienne statystyczna różnica częstości jej występowania wśród pacjentek z rodzinnym rakiem piersi a grupą kontrolną może wskazywać na związek tej mutacji z etiologią nowotworu piersi.

Do podobnych wniosków doszli badacze z innego polskiego ośrodka obserwując jednakże związek tej mutacji ze wzrostem ryzyka wystąpienia raczej sporadycznego nowotworu piersi, aniżeli tego, o podłożu dziedzicznym. Delecję tę wykryto u 11 spośród 562 nieselekcjonowanych raków piersi (1,96%) pochodzących od pacjentek z Polski centralnej. W grupie kontrolnej wykryto ją w 10 na 1620 badanych próbek (0,62%). Badania wykazały, że allele c.657_661del warunkuje nawet trzykrotnie wyższe ryzyko zachorowania na nowotwór piersi u kobiet < 40 r. ż. Autorzy zasugerowali, że ryzyko allele jest porównywalne do ryzyka mutacji c.5266dupC występującej w genie o wysokiej penetracji *BRCA1* (Steffen i in., 2006). Badania pacjentek pochodzących z Białorusi również wykazały korelację pomiędzy nosicielstwem mutacji c.657_661del, a wzrostem ryzyka rozwoju nowotworu piersi. W grupie 1558 pacjentek z nieselekcjonowanym rakiem piersi mutacja wystąpiła częściej (0,9%) niż w grupie kontrolnej (0,1%). Wynik był istotny statystycznie (Bogdanova i in., 2008a).

Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wydają się nie potwierdzać powyższych obserwacji. Mutacja c.657_661del znaleziona została u jednej ze 109 pacjentek z rodzinną agregacją zachorowań na nowotwory piersi i/lub jajnika (0,9%) i, pomimo iż częstość jej występowania w grupie badanej

była ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (1/2399; 0,41%), różnica nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0,9$). Wynik ten jest zgodny z innymi doniesieniami pochodzącymi z naszego ośrodka (Kanka i in., 2007). Wspomnianym badaniom poddano obciążone dziedziczną postacią nowotworu piersi i/lub jajnika pacjentki pochodzące z województwa pomorskiego. Różnica w częstości występowania mutacji słowiańskiej wśród pacjentek (0,8%) w porównaniu z grupą kontrolną (0,52%) nie była istotna statystycznie. Również Górski i wsp. (2005) w pracy określającej udział poszczególnych alleli predysponujących do rozwoju nowotworu piersi w Polsce nie wskazali na związek tej mutacji w etiologii raka piersi. Wyniki niniejszej pracy pozostają również w zgodzie także z danymi uzyskanymi w badaniu pacjentek pochodzących z Niemiec i Rosji (Buslov i in., 2005; Carlomagno i in., 1999). Mutacja c.657_661del wykryta została również z niską częstością (1/487) w badaniu pacjentek należących do grupy wysokiego ryzyka rozwoju raka piersi pochodzących z Czech. Częstość nie różniła się od wyników grupy kontrolnej (2/915) (Mateju i in., 2012).

Dane otrzymane w niniejszej pracy wskazują na udział mutacji słowiańskiej w niewielkiej części ogółu zachorowań na raka piersi i/lub jajnika w Polsce północnej. Różnica w częstości występowania mutacji w grupie badanej i kontrolnej nie osiągnęła statystycznej znamienności, należy jednak zaznaczyć, że opisywana zmiana jest rzadka, a niska liczba pacjentek wziętych do badania ogranicza możliwości analizy statystycznej. Istnieje wiele możliwych przyczyn występowania różnic w uzyskiwanych wynikach dotyczących udziału mutacji c.657_661del w rozwoju raka piersi wśród jej nosicieli. Najważniejszą przyczyną wynika z różnic populacyjnych, jednakże część jest konsekwencją odmiennych kryteriów doboru pacjentów, różnej charakterystyki guzów, jak również może wynikać z różnorodności stosowanych metod analizy molekularnej. Dodatkowo, jedynie badania prowadzone na dużych grupach umożliwiają pełną ocenę związku mutacji z ryzykiem rozwoju nowotworu.

Za wyjątkiem c.657_661del jedyną, jak dotąd, zmianą w genie *NBS1*, której homozygotyczna postać bezpośrednio prowadzi do powstania nowotworu, jest p.Ile171Val. Zmiana została po raz pierwszy opisana przez zespół Varona i wsp. (2001) u czworga dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną i jest kojarzona z podwyższonym ryzykiem występowania nowotworów hematologicznych i limfoidalnych (Mosor i in., 2006; Nowak i in., 2011; Shimada i in., 2004; Ziółkowska i in., 2007). Sugerowano również korelację pomiędzy obecnością tej mutacji, a występowaniem nowotworów szyi, głowy i krtani (Ziółkowska i in., 2007), jak również jelita grubego (Nowak i in., 2008). Pierwsze wyniki opisujące występującą współzależność między występowaniem tej mutacji a nowotworem piersi przedstawione zostały w pracy Różnowskiego i wsp. (2008). Autorzy zaobserwowali istotną statystycznie różnicę w częstości występowania tej zmiany w grupie 270 obciążonych rodzinnym rakiem piersi pacjentek a grupą kontrolną ($p=0,02$). Zasugerowano, że allel p.Ile171Val może być znaczącym czynnikiem ryzyka rozwoju raka piersi głównie wśród kobiet, których krewne pierwszego stopnia chorowały na ten nowotwór. Wyniki niniejszej pracy nie potwierdzają tej obserwacji, mutację tę zidentyfikowano u jednej spośród 109 pacjentek chorych na dziedzicznego raka piersi, a różnica w częstości, w porównaniu z grupą kontrolną, nie była znamienna statystycznie (10/754; $p=0,8$). Wynik uzyskany w obecnej pracy jest zgodny z doniesieniem zespołu Bogdanova i wsp. (2008b), którzy na podstawie badań pacjentek i grup kontrolnych pochodzących z Niemiec (10/1048 vs 7/1017) oraz Białorusi (20/1636 vs 18/1014) również nie zaobserwowali znamiennej częstości występowania mutacji p.Ile171Val. Różnic nie zaobserwowano również w innych pracach, w tym także pochodzących z Polski (Desjardins i in., 2009; Kanka i in., 2007). Wysoka i dość zmienna częstość wykrywanych mutacji p.Ile171Val w różnych populacjach może wskazywać na jedynie polimorficzny charakter tej zmiany. Co więcej, niewiele wiadomo, jaki efekt na funkcje nibryny wywołuje heterozygotyczna forma tej mutacji. Jak wcześniej sugerowano, substytucja Ile > Val może zaburzać funkcje białka i prowadzić do utraty stabilności genomowej komórki (Shimada i in., 2004). Ostatnio przeprowadzone badania funkcjonalne komórek z heterozygotyczną formą tej mutacji nie wykazały jednak znaczących różnic w liczbie pęknięć nici DNA indukowanych promieniowaniem jonizującym w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Autorzy nie potwierdzili wpływu tej zmiany na funkcje nibryny, podkreślają jednak, że jej potencjalny udział w rozwoju nowotworu nie może zostać wykluczony (Dzikiewicz-Krawczyk i in., 2012). Zasugerowano, że jeden z możliwych mechanizmów rozwoju nowotworów na skutek działania pozornie neutralnych heterozygotycznych mutacji tłumaczy teoria

„warunkowej haploinsuficjencji“ dotycząca genów zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA i kontroli cyklu komórkowego. Zgodnie z tym założeniem, w prawidłowej komórce mutacje te pozostają asymptomatyczne, jednakże w warunkach wzmożonego zapotrzebowania na naprawę uszkodzeń, jakim jest wczesne stadium rozwoju nowotworu, mutacja może ulec manifestacji. Wówczas ilość białka kodowanego przez prawidłowy allel może okazać się niewystarczająca do przeprowadzenia procesu naprawy i sygnalizowania uszkodzeń. Interesujące jest założenie, że gen *NBS1* nie jest genem supresorowym, a jego udział w rozwoju nowotworów wynika z „warunkowej haploinsuficjencji“ (Bartek i in., 2007; Demuth i Digweed, 2007).

Nowy wariant sekwencyjny p.Arg169His, wykryty u jednej pacjentki (1/100; 0,9%), polegał na zamianie argininy na histydynę w kodonie 169 genu *NBS1*. Zmiana wydaje się być rzadka, gdyż nie została zidentyfikowana w żadnej z 300 próbek kontrolnych stanowiących populacyjne tło genetyczne. Różnica częstości występowania w porównaniu z grupą badaną nie była statystycznie znamienna ($p=0,5$). Mutacja ta zlokalizowana jest w obrębie silnie konserwatywnej domeny BRCT, w bliskim sąsiedztwie ze związaną z predyspozycją do nowotworu (białaczki limfoblastycznej) mutacją p.Ile171Val. Dodatkowo pozycja 169 w szeregu aminokwasów budujących białko NBS1 jest silnie swoista dla argininy. Według Cersaletti i Concannon (2003) zmiany dotyczące wysoce konserwatywnych aminokwasów budujących domenę BRCT oraz FHA mogą zaburzać molekularne formowanie się kompleksu MRN oraz blokować fosforylację NBS1. Zgodnie z tym założeniem ta nowa zmiana wydaje się być interesującym obiektem do dalszych badań. Wyniki uzyskane z analizy bioinformatycznej są rozbieżne. Zgodnie z programami oceniającymi potencjalny wpływ tej substytucji na strukturę i funkcje białka, zaburzenie działania nibryny jest mało prawdopodobne. Obserwację wspiera fakt, że arginina i histydyna są aminokwasami o zbliżonej budowie, oba są polarne oraz należą do tej samej grupy aminokwasów zasadowych. Z kolei ocena wpływu zmiany na proces usuwania intronów wykazała utratę sygnału rozpoznawanego przez białka SRp55 oraz SF2/ASF wskazując na możliwe zaburzenie *splicingu*. Wobec braku możliwości uzyskania materiału od pacjentki analiza cDNA nie była wykonana, a wpływ tej mutacji na ryzyko rozwoju raka piersi i/lub jajnika nie może zostać wykluczony. Do pełnej oceny efektu biologicznego mutacji p.Arg169His oraz określenia jej potencjalnego znaczenia w procesie karcinogenezy niezbędne są badania funkcjonalne oraz analiza większej grupy pacjentek. Wnioski dotyczące tej mutacji są zgodne z postawionymi w pracy fińskiego zespołu, Heikkinen i wsp. (2003), dotyczącymi innej, sąsiadującej z p.Arg169His zmiany. Autorzy opisali potencjalnie patogenny wariant, p.Leu150Phe, zidentyfikowany również w domenie BRCT. Został wykryty na podstawie badań pacjentek z dziedzicznym nowotworem piersi (1/151; 0,7%). Wariantu nie zidentyfikowano w populacyjnej grupie kontrolnej ($n=1000$). Autorzy sugerują, że pomimo iż wyniki nie osiągnęły statystycznej istotności, wariant może być związany z pojawieniem się nowotworu u pacjentki oraz u jej córki, będącej również nosicielką tej zmiany.

W obecnej pracy zidentyfikowano również znane, częste polimorfizmy genu *NBS1*, a częstość ich występowania była zbliżona do zarejestrowanej w bazach SNP. Wariant sekwencyjny p.Glu185Gln obserwowany był z częstością ok. 50% w kilku populacjach m.in. słowackiej i hiszpańskiej (Thirumaran i in., 2006; Figueroa i in., 2007). Tylko dwa badania wskazały na jego związek ze wzrostem ryzyka rozwoju nowotworów: raka piersi (w badaniu amerykańskim) oraz płuc (w pracy chińskiej) (Lan i in., 2005; Lu i in., 2006). Częstość występowania kilku zidentyfikowanych w niniejszej pracy zmian polimorficznych (p.Leu34Leu, p.Asp399Asp i p.Pro672Pro) była badana wśród pacjentów z rakiem piersi, jajnika oraz płuc (Heikkinen i in., 2006; Lan i in., 2005). Jedyłą, jak dotąd, zaobserwowaną korelacją jest współwystępowanie zmiany p.Leu34Leu i homozygotycznej postaci p.Glu185Gln (Lu i in., 2006).

7.2. Zmiany w genie *RAD50* są obserwowane u pacjentów z rakiem piersi i/lub jajnika

Gen *RAD50*, w porównaniu z *NBS1*, nie był dotychczas tak szeroko badany. Wyniki badań w najnowszych doniesieniach wskazują, że mutacje tego genu są związane z predyspozycją do rozwoju nowotworów piersi i/lub jajnika. Najsilniejsze dowody, na których oparto to założenie pochodzą z wyników badań Heikkinen i wsp. (2006), którzy po raz pierwszy opisali mutację c.687delT skracającą obie izoformy białka *RAD50* o ok. 80%. Wspomniana mutacja wystąpiła u dwóch na 151 pacjentek z Finlandii pochodzących z rodzin obciążonych agregacją zachorowań na nowotwory piersi i/lub jajnika. Zmiana nie została znaleziona w grupie sporadycznych raków piersi, natomiast została wykryta z relatywnie wysoką częstością w populacyjnej grupie kontrolnej (6/1000; 0,6%) oraz wśród zdrowych członków badanych rodzin. Na podstawie tych obserwacji zasugerowano, że zmiana c.687delT jest wariantem o niskiej penetracji charakteryzującym się niekompletną segregacją i może być związany z ryzykiem wystąpienia dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika (Heikkinen i in., 2003). Kolejne wyniki badań tego zespołu wykazały, że mutacja predysponuje zarówno do nowotworu piersi o podłożu dziedzicznym, jak i o typie sporadycznym oraz potwierdziły obserwację jej niepełnej penetracji. Zgodnie z teorią „modelu poligenowego“ uważa się, że c.687delT jest allelem o niskiej penetracji, który współdziałając z mutacjami w innych genach może prowadzić do rozwoju raka piersi i/lub jajnika (Heikkinen i in., 2006). Mutacja jest związana z efektem założyciela występującym w populacji fińskiej, nie została zidentyfikowana w populacjach norweskiej, szwedzkiej, islandzkiej, francuskiej oraz angielskiej. Uważa się więc, że jej znaczenie ogranicza się do terenów Finlandii (Heikkinen i in., 2006; Tommiska i in., 2006; Uhrhammer i in., 2009).

W genie *RAD50* zidentyfikowany został również inny wariant prowadzący do przedwczesnej terminacji translacji. W badaniu Tommiska i wsp. (2006), u jednego pacjenta pochodzącego z Wielkiej Brytanii, zidentyfikowano zmianę p.Gln350Ter skracającą białko o 962 aminokwasów. Jednakże poprzez niską częstość występowania tej mutacji zasugerowano, że jej potencjalny wpływ na ogólną liczbę zachorowań na raka piersi i/lub jajnika jest niewielki.

W genie *RAD50*, oprócz mutacji prowadzących do skrócenia produktu białkowego, opisano kilka potencjalnie patogennych wariantów typu *missense*: p.Ile94Leu, p.Arg224His, p.Gln350Ter. Wszystkie powyższe zmiany występowały z niską częstością, przez co ich znaczenie w kancerogenezie nie zostało oszacowane (Heikkinen i in., 2003; Heikkinen i in., 2006; Tommiska i in., 2006).

Ocenę spektrum mutacji w genie *RAD50* w Polsce przeprowadził niedawno ośrodek z Poznania (Mosor i in., 2010). Analizie molekularnej poddano 280 nieselekcjonowanych kobiet z rakami piersi oraz 328 kobiet kontrolnych. W badaniu zidentyfikowano cztery zmiany eksonowe, z których jedna wskazana została przez programy komputerowe jako potencjalnie patogenna (p.Arg193Trp). Wspomniana substytucja zachodzi w miejscu kodującym segment wiążący białko MRE11, który jest niezbędny do prawidłowego formowania się kompleksu MRN po zajęciu DSBs (Assenmacher i Hopfner, 2004). Zmiana została zidentyfikowana u jednego pacjenta i była nieobecna w grupie kontrolnej. Autorzy podkreślają, że pomimo iż mutacja p.Arg193Trp prawdopodobnie uszkadza funkcję *RAD50*, poprzez rzadkie występowanie, jej potencjalny udział w ogólnej liczbie zachorowań na raka piersi i/lub jajnika jest ograniczony. Pozostałe zidentyfikowane w tym badaniu warianty (p.Val127Ile, p.Ala232Asp, p.Val315Leu) zostały sklasyfikowane przez bioinformatyczne programy predykcyjne jako tolerowane przez komórkę. Na tej podstawie oraz przez wzgląd na niską częstość ich występowania uważa się, że są neutralnymi polimorfizmami genu *RAD50*. Autorzy powyższej pracy nie zaobserwowali występowania w populacji polskiej pozostałych znanych mutacji w genie *RAD50*: p.Ile94Leu, c.214-1G>A, p.Arg224His, p.Gln350Ter. Nie zidentyfikowano również mutacji c.687delT potwierdzając brak udziału tej zmiany w ogólnej liczbie zachorowań na nowotwór piersi i/lub jajnika w Polsce.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z obserwacjami pracy Mosor i wsp. (2010). W naszym badaniu pacjentek z dziedzicznym rakiem piersi i/lub jajnika pochodzących z terenów północnej Polski również nie zaobserwowano żadnej ze znanych mutacji, w tym tych, wykrytych w badaniach tego zespołu, potwierdzając tym samym, że zmiany w genie *RAD50* są rzadkie, a ich rola w rozwoju nowotworów piersi i/lub jajnika w Polsce jest marginalna. W obecnej pracy zidentyfikowano natomiast nową, potencjalnie patogenną mutację c.749C>T (p.Pro250Leu) w genie *RAD50*. Była to

jedyna nowa zmiana znaleziona w częściach kodujących genu *RAD50*. Wykryta mutacja polegała na substytucji prolina przez leucynę i zachodziła w obrębie kodującym jedno z ramion białka. Prolina i leucyna różnią się pod względem biochemicznym, oba są niepolarne, lecz podczas gdy prolina jest aminokwasem cyklicznym, leucyna posiada rozgałęziony łańcuch węglowy. Prolina dodatkowo odróżnia się od leucyny oraz innych aminokwasów brakiem pierwszorzędowej grupy aminowej. Analiza poziomu konserwatywności aminokwasów u kilku gatunków wskazała na silnie swoistą dla prolina lokalizację w szeregu aminokwasów budujących ramię *coiled-coil*. Potencjalną patogenność tej substytucji potwierdzają dodatkowo wyniki badań uzyskane przy użyciu bioinformatycznych narzędzi predykcyjnych, które wskazały tę substytucję, jako potencjalnie zaburzającą polipeptydową strukturę i funkcję białka *RAD50*. Należy nadmienić, że zakładana potencjalna patogenność mutacji p.Pro250Leu oparta została na wynikach analiz komputerowych, zatem do pełnego zrozumienia wpływu nowo wykrytej zmiany na białko niezbędne będą badania funkcjonalne. Zmiana wydaje się być bardzo rzadka, wystąpiła tylko u jednej pacjentki i nie została zidentyfikowana w żadnej z 300 prób kontrolnych ($p=0,5$), dlatego określenie jej udziału w ogólnej liczbie dziedzicznych raków piersi i/lub jajnika możliwe jest jedynie poprzez przeprowadzenie badań na większej liczbie pacjentek i kontroli.

W niniejszej pracy zidentyfikowano także wcześniej nie opisywane dwa warianty intronowe. Oba wystąpiły w sekwencjach konsensus, c.756+5C>T w miejscu donorowym, c.1052-2A>C w miejscu akceptorowym dla białek biorących udział w procesie posttranskrypcyjnej obróbki mRNA. Na podstawie ich potencjalnie patogennego wpływu na ten proces, zostały zakwalifikowane do badań na poziomie cDNA. Pierwsza ze zmian, c.756+5C>T, polegała na substytucji cytozyny przez tyminę w pozycji +5 od końca eksonu. Pacjentka jest dodatkowo nosicielką mutacji w genie *BRC A2*, a nowotwór piersi wystąpił u niej w młodym wieku (35 r. ż.). Uważa się, że jedną z możliwych zasad działania alleli o niskiej penetracji jest wzmacnianie efektu współwystępującej mutacji w genie o wysokiej penetracji prowadząc do wcześniejszego wystąpienia choroby (Nathanson i in., 2002). Z uwagi na powyższe przesłanki mutację zakwalifikowano do dalszych badań na poziomie cDNA oraz przeprowadzono analizę kosegregacyjną w rodzinie. Mutacja została zidentyfikowana u zdrowej córki probantki nie będącej nosicielką mutacji w *BRC A2*. Nie zidentyfikowano jej natomiast w żadnej z 300 prób kontrolnych ($p=0,5$). Analiza poziomu konserwatywności zasad w sekwencji konsensus wykazała, że cytozyna w pozycji +5 charakteryzuje się niską swoistością. Przeprowadzone badania cDNA potwierdziły to założenie i wykazały brak wpływu tej zmiany na proces *splicingu* sugerując jej neutralny wpływ na białko *RAD50*.

Druga nowa zmiana intronowa, c.1052-2A>C, wystąpiła u jednej pacjentki, nie zidentyfikowano jej w grupie kontrolnej ($p=0,5$). Mutacja zachodzi w intronie siódmym i polega na zamianie adeniny na cytozynę w pozycji -2 od początku eksonu. Adenina w pozycji -2 jest silnie konserwowanym nukleotydem, substytucje w tym miejscu powodują zaburzenie procesu wycinania intronów na skutek zaburzenia miejsca rozpoznawalnego przez białka biorące udział w tym procesie. Mutacje zachodzące w pozycjach -1, -2 od początku eksonu z reguły prowadzą do wycięcia całego eksonu lub pozostawienia intronów i przepisania ich sekwencji na białko. Heikkinen i wsp. (2006) opisali przypadek mutacji *splicingowej* c.214-1G>A w genie *RAD50*, której konsekwencją jest zmiana ramki odczytu. Wynik analizy cDNA uzyskany dla zmiany c.1052-2A>C różnił się od oczekiwanego, nie wykazał bowiem zmian w analizowanej sekwencji. Wynik może świadczyć o braku wpływu tej mutacji na *splicing*, jednakże istnieje możliwość, że zmiana prowadzi do zaburzeń *splicingu* w innym rejonie mRNA lub tracony jest cały transkrypt, co tłumaczyłoby poprawny wynik sekwencjonowania. Wobec ograniczeń niniejszej pracy wynikających z braku możliwości uzyskania dodatkowego materiału do badań nie przeprowadzono dalszych analiz.

Kolejna zmiana zidentyfikowana w genie *RAD50*, p.Arg365Gln, została wykryta u pacjentki będącej nosicielką innej, rzadkiej mutacji w genie *MRE11* (opis w dalszej części dyskusji). Jest odnotowana w bazach danych jako rzadki wariant genu *RAD50* o neutralnym wpływie na funkcję białka. Efekt biologiczny wynikający ze współwystępowania tych dwóch zmian pozostaje niewyjaśniony.

Zmiany w genie *RAD50* wydają się być rzadkie a większość z nich identyfikowana była w pojedynczych badaniach. Uważa się, że nie odgrywają znaczącej roli w ogólnej liczbie zachorowań na raka piersi i/jajnika w populacji polskiej (Mosor i in., 2006). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają te obserwacje. Wszystkie potencjalnie patogene warianty wystąpiły u pojedynczych

pacjentek stanowiąc mniej niż 1% grupy badanej, a większość z tych zmian nie została również wykryta w grupie kontrolnej, co utrudnia osiągnięcie statystycznie znamiennej różnicy w częstości ich występowania. Jak dotąd istotną statystycznie różnicę ($p=0,008$) zaobserwowano jedynie w badaniu fińskim i dotyczyła ona częstości występowania mutacji c.687delT w grupie 317 nieselekcjonowanych raków piersi i w populacyjnej grupie kontrolnej (6/1000). Uważa się, że rzadkie mutacje typu *nonsense* w genie *RAD50*, takie jak c.687delT i p.Gln350Ter nawet czterokrotnie zwiększają ryzyko wystąpienia raka piersi. Dostępne dane nie wskazują jednak na podobną predyspozycję wynikającą z nosicielstwa mutacji *missense*. Należy podkreślić, że możliwą przyczyną braku takich doniesień jest fakt, że wiele wykrytych mutacji zmiany sensu nie zostało poddanych dalszym badaniom określającym ich biologiczne znaczenie. Są to mutacje, które wystąpiły u pojedynczych pacjentów, zostały wskazane przez programy predykcyjne za neutralne dla białka lub nie były badane w grupach kontrolnych (Heikkinen i in., 2003; Mosor i in., 2010; Tommiska i in., 2006).

7.3. Udział mutacji genu *MRE11* w dziedzicznej predyspozycji do rozwoju raka piersi i/lub jajnika

Wyniki wskazujące na istnienie w genach *NBS1* i *RAD50* alleli zwiększających ryzyko zachorowania na raka piersi i/lub jajnika skierowały uwagę badaczy w kierunku poszukiwań patogennych mutacji w trzecim genie kodującym kompleks MRN, *MRE11* (Górski i in., 2003; Heikkinen i in., 2006; Tommiska i in., 2006). Wyniki pierwszych doniesień świadczyły o istnieniu mutacji genu *MRE11* w guzach pierwotnych. W badaniu 159 tkanek m.in. guzów piersi i guzów limfatycznych, zidentyfikowano trzy somatyczne mutacje zlokalizowane w miejscach kodujących silnie konserwowane domeny (p.Ser104Cys; p.Arg503His; p.Arg572Gln) oraz, w przypadku jednego guza piersi, nieprawidłowy transkrypt prowadzący do skrócenia białka MRE11 (Fukuda i in., 2001). W innej pracy opisano wariant germinalny p.Arg305Trp zidentyfikowany u jednej pacjentki z rakiem jajnika. Mutacja była zlokalizowana w końcowej części wysoce konserwatywnej domeny białka MRE11 i polegała na zamianie odmiennych biochemicznie aminokwasów. Dodatkowo nie została znaleziona w grupie sporadycznych raków piersi oraz w próbkach kontrolnych stanowiących tło populacyjne (n=1000). Autorzy zasugerowali, że mutacja może zwiększać predyspozycję do nowotworu (Heikkinen i in., 2003). W sąsiedztwie ze wspomnianą zmianą zlokalizowany jest inny, rzadki wariant, p.His302Tyr, który został opisany u jednej pacjentki z rakiem piersi o podłożu dziedzicznym (Sjoblom i in., 2006). Do ważnych odkryć doprowadziły badania zespołu Bartkova i wsp. (2008). Analiza DNA wyizolowanego z krwi pochodzącej od ośmiu pacjentów, u których w guzach zaobserwowano zmniejszenie ekspresji białek kompleksu MRN, wykazała obecność dwóch potencjalnie patogennych, germinalnych mutacji w genie *MRE11*. Pierwsza ze zmian, p.Arg202Gly, wystąpiła u jednej pacjentki i w jednej z 363 anonimowych próbek kontrolnych. Autorzy zasugerowali, że może być jedynie rzadkim polimorfizmem genu *MRE11*, jednak zgodnie z przewidywaniami programu SIFT i PolyPhen2 istnieje możliwość, że zmiana zaburza strukturę i funkcję białka. Druga zmiana to heterozygotyczna mutacja skracająca produkt białkowy, p.Arg633Ter. Patogenność tej zmiany potwierdza dodatkowo fakt, że w formie homozygotycznej prowadzi do zespołu ATDL (Bartkova i in., 2008; Stewart i in., 1999).

Większość wcześniej opisanych, potencjalnie patogennych zmian w genie *MRE11* obserwowano tylko w pojedynczych badaniach. W niniejszej pracy nie potwierdzono ich występowania - wszystkie wykryte w obecnym badaniu warianty sekwencyjne były znane i odnotowane w bazach SNP i/lub w literaturze (Bartkova i in., 2008; Fostira i in., 2007; Offer i in., 2010). Częstość występowania zmian intronowych była zbliżona do częstości odnotowanej w bazach danych, na tej podstawie sklasyfikowano je jako neutralne polimorfizmy genu *MRE11*.

U dwóch pacjentek w niniejszej pracy wykryto zmianę *missense*, p.Ala492Asp, polegającą na substytucji silnie swoistego aminokwasu w pobliżu konserwatywnej domeny białka MRE11. Zmiany nie zidentyfikowano w żadnej z 300 próbek kontrolnych a różnica nie była istotna statystycznie. W bazach danych i literaturze zmiana p.Ala492Asp określana jest jako rzadki wariant o nieznanym wpływie na patogenezę raka piersi i/lub jajnika. Jak dotąd opisany został jedynie w badaniu pacjentów z zespołem niedoboru odporności, w którym zakwalifikowana została jako polimorfizm genu *MRE11* (Offer i in., 2010). Wynik programu PolyPhen2 wskazuje, że wariant p.Ala492Asp może zaburzać funkcję białka MRE11. Założenie to nie zostało jednak potwierdzone przy użyciu innych algorytmów (ALAMUT, SIFT). Jedna z pacjentek, u których wykryto tę zmianę, była dodatkowo nosicielką mutacji w genie *RAD50*, p.Arg365Gln. Efekt biologiczny wynikający ze współwystępowania tych dwóch zmian pozostaje niewyjaśniony.

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że mutacje w genie *MRE11* są rzadkie i nie stanowią istotnej części podłoża dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika w Polsce. Jak dotąd jedynie w badaniu Bartkova i wsp. (2008) zasugerowano, że mutacje w tym genie mogą być allelami niskiej penetracji. W niniejszej pracy jedyną potencjalnie patogenną zmianą był nowy wariant p.Ala492Asp, jednak do pełnej oceny jego biologicznego znaczenia niezbędne są dalsze badania.

7.4. Podsumowanie

Podłoże genetyczne dziedzicznego raka piersi i jajnika znane jest w 25–30% przypadków (Easton, 1999; Maxwell i Nathanson, 2013). Obserwacje białek zaangażowanych w proces naprawy DNA wskazują, że analiza molekularna kodujących je genów jest odpowiednim kierunkiem poszukiwań nowych alleli zwiększających ryzyko zachorowania na te nowotwory. W niniejszej pracy, podjęto próbę oceny spektrum i częstości występowania zmian sekwencyjnych w genach *NBS1*, *RAD50* i *MRE11* kodujących białka kompleksu MRN, który wraz z BRCA1/2 uczestniczy w naprawie uszkodzeń DNA. Grupę badaną stanowiło 109 pacjentek z północnej Polski pochodzących z rodzin obciążonych silną agregacją zachorowań na raki piersi i/lub jajnika.

Nosicielstwo mutacji w genie *NBS1* jest związane z rozwojem wielu typów nowotworów, jednak udział mutacji słowiańskiej, c.657_661del, w tym genie w etiologii raka piersi i/lub jajnika w Polsce pozostaje niewyjaśniony. W niniejszej pracy zmiana ta została zidentyfikowana u jednej pacjentki. Wynik ten jest zgodny z doniesieniami innych polskich zespołów i wskazuje na brak wyraźnego wpływu tej mutacji na wzrost ryzyka rozwoju nowotworu piersi i/lub jajnika w populacji polskiej. Nie mniej jednak przez wzgląd na rozbieżne doniesienia dotyczące roli mutacji słowiańskiej w etiologii tych nowotworów niezbędne będą badania prowadzone na dużych grupach pacjentek. U jednej pacjentki zidentyfikowano znaną patogenną mutację w genie *NBS1* - p.Ile171Val - nie zaobserwowano jednak istotnie statystycznej różnicy w częstości jej występowania w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik ten wskazuje na możliwie polimorficzny charakter tej zmiany. W niniejszej pracy wykryto nową potencjalnie patogenną zmianę w genie *NBS1*, p.Arg169His, zlokalizowaną w obrębie domeny BRCT. Wpływ tej mutacji na funkcję białka oraz proces *splicingu* wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Wyniki analizy genu *RAD50* są zgodne z danymi uzyskanymi w równoległe prowadzonych badaniach w poznańskim ośrodku i wskazują na marginalny udział mutacji w tym genie w patogenezie raka piersi i/lub jajnika. W niniejszej pracy zidentyfikowano dwie nowe zmiany w genie *RAD50*, które zgodnie z analizami programów bioinformatycznych są potencjalnie patogene. Pierwsza z nich, p.Pro250Leu, zidentyfikowana została u jednej pacjentki, nie została wykryta w grupie kontrolnej. Porównanie częstości występowania tej zmiany nie wskazało na istotnie statystyczną różnicę, nie mniej jednak jej udział w rozwoju raka piersi i/lub jajnika nie może zostać wykluczony. Druga zmiana, c.1052-2A>C, wystąpiła w sekwencji konsensus, co sugeruje jej wpływ na proces *splicingu*. Pomimo iż badania przeprowadzone na poziomie cDNA nie potwierdziły tych założeń, zmiana wydaje się być interesującym celem dalszych badań.

Zidentyfikowano rzadki wariant genu *MRE11* - p.Ala492Asp - u pacjentki będącej jednocześnie nosicielką zmiany p.Arg365Gln w genie *RAD50*. Wyniki analiz bioinformatycznych są rozbieżne, a efekt biologiczny powodowany przez skumulowanie działań tych dwóch zmian pozostaje do wyjaśnienia.

Dotychczasowe opublikowane wyniki wskazują, że patogene mutacje w genach *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* wydają się być rzadkie. W niniejszym badaniu wszystkie potencjalnie uszkodzające białko warianty sekwencyjne obserwowane były w mniej niż w 1% badanej grupy kobiet. Badana grupa pacjentek była stosunkowo niewielka, stąd też istnieje możliwość, że potencjalnie patogene mutacje w genach kompleksu MRN istnieją w populacji polskiej. Wydaje się jednak mało prawdopodobne, aby zmiany w tych genach stanowiły istotne znaczenie w ogólnej liczbie zachorowań na nowotwory piersi i/lub jajnika w Polsce.

Wyniki niniejszej pracy są zgodne z hipotezą dotyczącą wielogenowego podłoża dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika, która zakłada, że część zachorowań na te nowotwory wynika ze skumulowanego działania różnych alleli genów o niskiej lub umiarkowanej penetracji. Efekt działania tych genów może być dodatkowo modyfikowana przez czynniki środowiskowe lub polimorfizmy innych genów. Uważa się, że istotny udział w rozwoju tych nowotworów może mieć skumulowane działanie tych częstych wariantów polimorficznych.

Celem przyszłych badań będzie zarówno identyfikacja nowych genetycznych czynników ryzyka, jak również pełne scharakteryzowanie już poznanych. W tym celu niezbędne będą badania prowadzone na różnych populacjach i w dużych grupach badanych i kontrolnych. Przy użyciu metody sekwencjonowania nowej generacji (ang. *Next – Generation Sequencing*, NGS) możliwe staje się stworzenie panelu genów, których mutacje predysponują do rozwoju nowotworów piersi i/lub jajnika.

8. WNIOSKI

1. Potwierdzono obecność patogennych mutacji c.657_661del oraz p.Ile171Val w genie *NBS1* wśród pacjentek pochodzących z rodzin obciążonych agregacją zachorowań na nowotwory piersi i/lub jajnika. Różnica częstości występowania tych mutacji w porównaniu z grupą kontrolną nie osiągnęła jednak istotności statystycznej.
2. Zaobserwowanie nowych potencjalnie patogennych zmian: p.Ala492Asp w genie *MRE11*, p.Pro250Leu i c.1052-2A>C w genie *RAD50* oraz p.Arg169His w *NBS1* wskazuje na konieczność przeprowadzenia dalszych badań w celu pełnego określenia ich patogennego charakteru.
3. Uzyskane wyniki badań genów *MRE11*, *RAD50* i *NBS1* pozostają w zgodzie z innymi doniesieniami i wskazują, że patogenne mutacje w tych genach są rzadkie i stanowią niski odsetek ogólnej liczby zachorowań na dziedziczne nowotwory piersi i/lub jajnika w Polsce.

9. PIŚMIENICTWO

- Antoccia A, Kobayashi J, Tauchi H et al. Nijmegen breakage syndrome and functions of the responsible protein, NBS1. *Genome Dyn* 2006; 1: 191-205.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1117-1130.
- Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 2006; 25: 5898-5905.
- Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G et al. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer* 2002; 86: 76-83.
- Assenmacher N, Hopfner KP. MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 2004; 113: 157-166.
- Bartek J, Lukas J, Bartkova J. DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. *Cell Cycle* 2007; 6: 2344-2347.
- Bartkova J, Tommiska J, Oplustilova L et al. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Mol Oncol* 2008; 2: 296-316.
- Becker E, Meyer V, Madaoui H et al. Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics* 2006; 22: 1289-1292.
- Bell DW, Varley JM, Szydlo TE et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286: 2528-2531.
- Bergman A, Flodin A, Engwall Y et al. A high frequency of germline BRCA1/2 mutations in western Sweden detected with complementary screening techniques. *Fam Cancer* 2005; 4: 89-96.
- Berkovich E, Monnat RJ, Jr., Kastan MB. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 683-690.
- Bernstein KA, Rothstein R. At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell* 2009; 137: 807-810.
- Bierne H, Ehrlich SD, Michel B. Deletions at stalled replication forks occur by two different pathways. *Embo j* 1997; 16: 3332-3340.
- Bogdanova N, Feshchenko S, Schurmann P et al. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 2008a; 122: 802-806.
- Bogdanova N, Schurmann P, Waltes R et al. NBS1 variant I171V and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2008b; 112: 75-79.
- Borresen AL, Andersen TI, Garber J et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res* 1992; 52: 3234-3236.
- Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 229-239.
- Brynhildsen J. Combined hormonal contraceptives: prescribing patterns, compliance, and benefits versus risks. *Ther Adv Drug Saf* 2014; 5: 201-213.
- Brownstein MH, Wolf M, Bikowski JB. Cowden's disease: a cutaneous marker of breast cancer. *Cancer* 1978; 41: 2393-2398.
- Cantor S, Drapkin R, Zhang F et al. The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2357-2362.
- Cantor SB, Bell DW, Ganesan S et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001; 105: 149-160.
- Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Yeo TC et al. Retroviral expression of the NBS1 gene in cultured Nijmegen breakage syndrome cells restores normal radiation sensitivity and nuclear focus formation. *Mutagenesis* 2000; 15: 281-286.
- Chen J, Silver DP, Walpita D et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 1998; 2: 317-328.
- Chrzanowska KH, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E et al. Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies. *Int J Cancer* 2006; 118: 1269-1274.
- Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD et al. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996; 77: 2318-2324.
- Cortez D, Wang Y, Qin J et al. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999; 286: 1162-1166.
- Couch FJ, Farid LM, DeShano ML et al. BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 1996; 13: 123-125.

- Cybulski C, Gorski B, Debniak T et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 2004; 64: 1215-1219.
- Cybulski C, Gorski B, Huzarski T et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 1131-1135.
- Cybulski C, Lubinski J, Wokolorczyk D et al. Mutations Predisposing to Breast Cancer in 12 Candidate Genes in Breast Cancer Patients from Poland. *Clin Genet* 2014; 10.1111/cge.12524. [Epub ahead of print]
- Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH. Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet* 2008; 49: 383-396.
- de Jager M, van Noort J, van Gent DC et al. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 2001; 8: 1129-1135.
- Demuth I, Digweed M. The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene* 2007; 26: 7792-7798.
- Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, Concannon P. Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2184-2191.
- Dolganov GM, Maser RS, Novikov A et al. Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4832-4841.
- Dupre A, Boyer-Chatenet L, Gautier J. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 451-457.
- Dzikiewicz-Krawczyk A, Mosor M, Januszkiewicz D et al. Impact of heterozygous c.657-661del, p.I171V and p.R215W mutations in NBN on nibrin functions. *Mutagenesis* 2012; 27: 337-343.
- Easton D, Ford D, Peto J. Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv* 1993; 18: 95-113.
- Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Res* 1999; 1: 14-17.
- Erkko H, Xia B, Nikkila J et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 2007; 446: 316-319.
- Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 2005; 434: 605-611.
- Fan S, Ma YX, Wang C et al. Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene* 2001; 20: 77-87.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1374-1403.
- Feuer EJ, Wun LM, Boring CC et al. The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 892-897.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-1038.
- Fodor FH, Weston A, Bleiweiss IJ et al. Frequency and carrier risk associated with common BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 45-51.
- Fostira F, Thodi G, Konstantopoulou I et al. Hereditary cancer syndromes. *J buon* 2007; 12 Suppl 1: S13-22.
- Foulkes WD, Ghadirian P, Akbari MR et al. Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R83.
- Frappart PO, McKinnon PJ. Ataxia-telangiectasia and related diseases. *Neuromolecular Med* 2006; 8: 495-511.
- Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T et al. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 313-319.
- Fukuda T, Sumiyoshi T, Takahashi M et al. Alterations of the double-strand break repair gene MRE11 in cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 23-26.
- Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000; 119: 1447-1453.
- Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU et al. Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer* 2004; 101: 51-57.
- Glover JN. Insights into the molecular basis of human hereditary breast cancer from studies of the BRCA1 BRCT domain. *Fam Cancer* 2006; 5: 89-93.
- Gorski B, Byrski T, Huzarski T et al. Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1963-1968.
- Gorski B, Cybulski C, Huzarski T et al. Breast cancer predisposing alleles in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92: 19-24.
- Gorski B, Debniak T, Masojc B et al. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 106: 379-381.

- Gorski B, Jakubowska A, Huzarski T et al. A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer* 2004; 110: 683-686.
- Gudas JM, Li T, Nguyen H et al. Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 717-723.
- Hall JM, Lee MK, Newman B et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-1689.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 1: 57-70.
- Hedenfalk IA, Ringner M, Trent JM et al. Gene expression in inherited breast cancer. *Adv Cancer Res* 2002; 84: 1-34.
- Heikkinen K, Karppinen SM, Soini Y et al. Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. *J Med Genet* 2003; 40: e131.
- Heikkinen K, Rapakko K, Karppinen SM et al. RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. In, *Carcinogenesis* 2006; 1593-1599.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374.
- Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res* 2003; 63: 1449-1453.
- Hopfner KP, Craig L, Moncalian G et al. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 2002; 418: 562-566.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS et al. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 2000; 101: 789-800.
- Hopfner KP, Putnam CD, Tainer JA. DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12: 115-122.
- Houlston RS, Peto J. The future of association studies of common cancers. *Hum Genet* 2003; 112, 434-435.
- Hultborn R, Hanson C, Kopf I et al. Prevalence of Klinefelter's syndrome in male breast cancer patients. *Anticancer Res* 1997; 17: 4293-4297.
- Irminger-Finger I, Leung WC, Li J et al. Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8: 1255-1266.
- Jakubowska A, Cybulski C, Szymanska A et al. BARD1 and breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 119-122.
- Jefford CE, Feki A, Harb J et al. Nuclear-cytoplasmic translocation of BARD1 is linked to its apoptotic activity. *Oncogene* 2004; 23: 3509-3520.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29.
- Kanka C, Brozek I, Skalska B et al. Germline NBS1 mutations in families with aggregation of Breast and/or ovarian cancer from north-east Poland. *Anticancer Res* 2007; 27: 3015-3018.
- Karppinen SM, Heikkinen K, Rapakko K et al. Mutation screening of the BARD1 gene: evidence for involvement of the Cys557Ser allele in hereditary susceptibility to breast cancer. *J Med Genet* 2004; 41: e114.
- Karppinen SM, Vuosku J, Heikkinen K et al. No evidence of involvement of germline BACH1 mutations in Finnish breast and ovarian cancer families. *Eur J Cancer* 2003; 39: 366-371.
- Katagiri T, Saito H, Shinohara A et al. Multiple possible sites of BRCA2 interacting with DNA repair protein RAD51. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 217-222.
- Kim JE, Minter-Dykhouse K, Chen J. Signaling networks controlled by the MRN complex and MDC1 during early DNA damage responses. *Mol Carcinog* 2006; 45: 403-408.
- Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-823.
- Kobayashi J. Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to gamma-H2AX through FHA/BRCT domain. *J Radiat Res* 2004; 45: 473-478.
- Kobayashi J, Okui M, Asaithamby A et al. WRN participates in translesion synthesis pathway through interaction with NBS1. *Mech Ageing Dev* 2010; 131: 436-444.
- Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high grade serous carcinoma. *Ann Oncol* 2013; 24: x16-21.
- Lan Q, Shen M, Berndt SI et al. Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer* 2005; 49: 317-323.
- Li FP, Fraumeni JF, Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71: 747-752.
- Liaw D, Marsh DJ, Li J et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997; 16: 64-67.

- Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 181-211.
- Lim W, Hearle N, Shah B et al. Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *Br J Cancer* 2003; 89: 308-313.
- Limon J. Genetyczne podłoże chorób nowotworowych, w: *Genetyka molekularna* (red. Węgleński P.); Wyd. PWN, Warszawa 2006; str. 400-429.
- Lloyd J, Chapman JR, Clapperton JA et al. A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. *Cell* 2009; 139: 100-111.
- Lombard DB, Guarente L. Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res* 2000; 60: 2331-2334.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S et al. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11364-11369.
- Lu J, Wei Q, Bondy ML et al. Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women <or=55 years. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2209-2216.
- Lukanova A, Kaaks R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 98-107.
- Malkin D, Li FP, Strong LC et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-1238.
- Mateju M, Kleiblova P, Kleibl Z et al. Germline mutations 657del5 and 643C>T (R215W) in NBN are not likely to be associated with increased risk of breast cancer in Czech women. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 809-811.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007; 316: 1160-1166.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998; 282: 1893-1897.
- Maxwell KN, Nathanson KL. Common breast cancer risk variants in the post-COGS era: a comprehensive review. *Breast Cancer Res* 2013; 15: 212.
- Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 2002; 31: 55-59
- Michel B, Ehrlich SD, Uzest M. DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *Embo j* 1997; 16: 430-438.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
- Mirzoeva OK, Petrini JH. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 281-288.
- Mosor M, Ziolkowska I, Pernak-Schwarz M et al. Association of the heterozygous germline I171V mutation of the NBS1 gene with childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Leukemia*. England; 2006: 1454-1456.
- Mosor M, Ziolkowska-Suchanek I, Roznowski K et al. RAD50 gene mutations are not likely a risk factor for breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123: 607-609.
- Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 665-676.
- Nathanson KL, Shugart YY, Omaruddin R et al. CGH-targeted linkage analysis reveals a possible BRCA1 modifier locus on chromosome 5q. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1327-1332.
- Nathanson KL, Weber BL. "Other" breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 715-720.
- Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA et al. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* 1996; 13: 114-116.
- Nowak J, Mosor M, Nowicka K et al. Is the NBN gene mutation I171V a potential risk factor for malignant solid tumors in children? *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33: e248-249.
- Oberaigner W, Minicozzi P, Bielska-Lasota M et al. Survival for ovarian cancer in Europe: the across-country variation did not shrink in the past decade. *Acta Oncol* 2012; 51: 441-453.
- Offer SM, Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L et al. Unique DNA repair gene variations and potential associations with the primary antibody deficiency syndromes IgAD and CVID. *PLoS One* 2010; 5: e12260.
- Ogawa H, Johzuka K, Nakagawa T et al. Functions of the yeast meiotic recombination genes, MRE11 and MRE2. *Adv Biophys* 1995; 31: 67-76.
- Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ et al. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63: 125-149.
- Patel KJ, Yu VP, Lee H et al. Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* 1998; 1: 347-357.

- Paull TT, Gellert M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 1999; 13: 1276-1288.
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000; 10: 886-895.
- Perkowska M, BroZek I, Wysocka B et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mutat* 2003; 21: 553-554.
- Perets R, Wyant GA, Muto KW et al. Transformation of the fallopian tube secretory epithelium leads to high-grade serous ovarian cancer in Brca;Tp53;Pten models. *Cancer Cell* 2013; 24: 751-765.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
- Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 1997; 17: 341-345.
- Petrini JH, Stracker TH. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 458-462.
- Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M et al. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *In, Nat Genet.* United States; 2002: 33-36.
- Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF et al. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *In, N Engl J Med.* United States: 2008 Massachusetts Medical Society; 2008: 2796-2803.
- Pike MC, Pearce CL, Wu AH. Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene* 2004; 23: 6379-6391.
- Polanowska J, Martin JS, Garcia-Muse T et al. A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *Embo j* 2006; 25: 2178-2188.
- Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations ,and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012; 3: 237-249.
- Ratajska M, Antoszevska E, Piskorz A et al. Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131: 89-97.
- Ratajska M, Brozek I, Senkus-Konefka E et al. BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland. *Oncol Rep* 2008; 19: 263-268.
- Reid S, Schindler D, Hanenberg H et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 162-164.
- Riman T, Dickman PW, Nilsson S et al. Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer: results from a Swedish case-control study. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 363-373.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; 273: 5858-5868.
- Rosenblatt KA, Thomas DB, McTiernan A et al. Breast cancer in men: aspects of familial aggregation. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 849-854.
- Sabate JM, Gomez A, Torrubia S et al. Evaluation of breast involvement in relation to Cowden syndrome: a radiological and clinicopathological study of patients with PTEN germ-line mutations. *Eur Radiol* 2006; 16: 702-706.
- Scully R, Chen J, Plug A et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88: 265-275.
- Seal S, Thompson D, Renwick A et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006; 38: 1239-1241.
- Seemanova E. An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutat Res* 1990; 238: 321-324.
- Seemanova E, Jarolim P, Seeman P et al. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1875-1880.
- Shakya R, Szabolcs M, McCarthy E et al. The basal-like mammary carcinomas induced by Brca1 or Bard1 inactivation implicate the BRCA1/BARD1 heterodimer in tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7040-7045.
- Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 1997; 386: 804-810.
- Shen SX, Weaver Z, Xu X et al. A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene* 1998; 17: 3115-3124.
- Shimada H, Shimizu K, Mimaki S et al. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Hum Genet* 2004; 115: 372-376.
- Siedlecki JA. Choroby nowotworowe, w: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej* (red. Bal J.); Wyd. PWN, Warszawa; str. 336-348.

- Sjoblom T, Jones S, Wood LD et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314: 268-274.
- Smith TM, Lee MK, Szabo CI et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 1996; 6: 1029-1049.
- Spain BH, Larson CJ, Shihabuddin LS et al. Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13920-13925.
- Stacey SN, Sulem P, Johannsson OT et al. The BARD1 Cys557Ser variant and breast cancer risk in Iceland. *PLoS Med* 2006; 3: e217.
- Steffen J, Varon R, Mosor M et al. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 2004; 111: 67-71.
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T et al. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 1999; 99: 577-587.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009; 458: 719-724.
- Sun H, Treco D, Schultes NP et al. Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* 1989; 338: 87-90.
- Szabo CI, Worley T, Monteiro AN. Understanding germ-line mutations in BRCA1. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 515-520.
- Thai TH, Du F, Tsan JT et al. Mutations in the BRCA1-associated RING domain (BARD1) gene in primary breast, ovarian and uterine cancers. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 195-202.
- Thirumaran RK, Bermejo JL, Rudnai P et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and basal cell carcinoma of skin. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1676-1681.
- Thompson D, Duedal S, Kirner J et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 813-822.
- Thompson D, Easton D. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 410-419.
- Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. In, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. United States; 2004: 221-236.
- Thompson D, Szabo CI, Mangion J et al. Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 827-831.
- Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 1996; 13: 117-119.
- Thull DL, Vogel VG. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist* 2004; 9: 13-24.
- Tommiska J, Seal S, Renwick A et al. Evaluation of RAD50 in familial breast cancer predisposition. *Int J Cancer* 2006; 118: 2911-2916.
- Uhrhammer N, Delort L, Bignon YJ. Rad50 c.687delT does not contribute significantly to familial breast cancer in a French population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 684-685.
- Usui T, Ohta T, Oshiumi H et al. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* 1998; 95: 705-716.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L et al. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo j* 2003; 22: 5612-5621.
- van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. In, *EMBO Rep*. England; 2003: 844-849.
- van der Linden E, Sanchez H, Kinoshita E et al. RAD50 and NBS1 form a stable complex functional in DNA binding and tethering. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 1580-1588.
- Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 900-902.
- Varon R, Vissinga C, Platzer M et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. In, *Cell*. United States; 1998: 467-476.
- Verdun RE, Crabbe L, Haggblom C et al. Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle. *Mol Cell* 2005; 20: 551-561.
- Walters R, Kalb R, Gatei M et al. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 605-616.
- Wang HC, Chou WC, Shieh SY et al. Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* 2006; 66: 1391-1400.
- Wang Q, Zhang H, Fishel R et al. BRCA1 and cell signaling. *Oncogene* 2000; 19: 6152-6158.
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P et al. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000; 14: 927-939.

- Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988; 35: 95-125.
- Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C et al. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 2008; 26: 542-548.
- Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 20-26.
- Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1212-1220.
- Williams RS, Dodson GE, Limbo O et al. Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell* 2009; 139: 87-99.
- Williams RS, Moncalian G, Williams JS et al. Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* 2008; 135: 97-109.
- Williams RS, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 509-520.
- Wiltzius JJ, Hohl M, Fleming JC et al. The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 403-407.
- Wong MW, Nordfors C, Mossman D. BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127: 853-859.
- Wong-Brown MW, Avery-Kiejda AK, Bowden NA. Low prevalence of germline PALB2 mutations in Australian triple-negative breast cancer. *Int J Cancer* 2013; 134: 301-305.
- Woodward AM, Davis TA, Silva AG et al. Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *J Med Genet* 2005; 42: e31.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792.
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088-2090.
- Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. In: *N Engl J Med*. United States; 2003: 2339-2347.
- Wu LC, Wang ZW, Tsan JT et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 1996; 14: 430-440.
- Xu X, Weaver Z, Linke SP et al. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 1999; 3: 389-395.
- Yang H, Jeffrey PD, Miller J et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 2002; 297: 1837-1848.
- Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 2004; 95: 866-871.
- You Z, Bailis JM. DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol* 2010; 20: 402-409.
- Yu X, Chini CC, He M et al. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 2003; 302: 639-642.
- Zhu XD, Kuster B, Mann M et al. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000; 25: 347-352.
- Zhuang J, Jiang G, Willers H et al. Exonuclease function of human Mre11 promotes deletional nonhomologous end joining. *J Biol Chem* 2009; 284: 30565-30573.
- Zhuang J, Zhang J, Willers H et al. Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* 2006; 66: 1401-1408.
- Ziolkowska I, Mosor M, Nowak J. Regional distribution of heterozygous 657del5 mutation carriers of the NBS1 gene in Wielkopolska province (Poland). *J Appl Genet* 2006; 47: 269-272.
- Ziolkowska I, Mosor M, Wierzbicka M et al. Increased risk of larynx cancer in heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene. *Cancer Sci* 2007; 98: 1701-1705.

Dziękuję

Panu Profesorowi Januszowi Limonowi za opiekę promotorską w czasie prowadzenia pracy badawczej i pisania rozprawy doktorskiej.

Współpracownikom z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki za życzliwą pomoc i wsparcie.

Mojej Mamie i Mężowi Krzysztofowi za miłość i radość w moim życiu.