

Magdalena Stepnowska

Analiza zjawiska utraty heterozygotyczności (LOH) w chromosomach 3, 11, X w guzach nowotworowych kobiet ze sporadyczną i dziedziczną postacią raka jajnika.

(rozprawa doktorska)

Praca wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki AMG  
Kierownik i promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

Gdańsk 2008

Praca została sfinansowana z grantu KBN nr 3P05A07024.

Pracę wykonano w ramach Środowiskowego Studium Doktoranckiego z Biologii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego.

## SPIS TREŚCI

1.	Wykaz najczęściej stosowanych skrótów	5
2.	Wstęp	6
2.1.	Zachorowalność na raka jajnika	6
2.2.	Teorie powstania raka jajnika	6
2.2.1.	Teoria owulacji	7
2.2.2.	Teoria gonadotropinowa	7
2.2.3.	Dualistyczny model rozwoju raka jajnika	8
2.3.	Dziedziczne postacie raka jajnika	8
2.4.	Budowa i rola genów <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	10
2.4.1.	Mutacje w genach <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	14
2.5.	Teoria Knudsona	15
2.6.	Technika LOH	16
2.6.1.	Sekwencje markerowe stosowane w LOH	18
2.6.2.	Metody stosowane w badaniu LOH	19
2.6.3.	Utraty heterozygotyczności w raku jajnika	19
3.	Cele pracy	26
4.	Materiał	27
4.1.	Dane kliniczne badanych pacjentów	28
5.	Metody	32
5.1.	Aparatura	32
5.2.	Odczynniki	32
5.3.	Roztwory	34
5.4.	Izolacja DNA	35
5.4.1.	Izolacja DNA z krwi obwodowej	35
5.4.2.	Izolacja DNA z mrożonej tkanki nowotworowej	36
5.4.3.	Izolacja DNA z tkanek nowotworowych zatopionych w parafinie	36
5.5.	Technika LOH	37
5.5.1.	Markery mikrosatelitarne z chromosomu 3	37
5.5.2.	Markery mikrosatelitarne z chromosomu 11	39
5.5.3.	Markery mikrosatelitarne z chromosomu X	40
5.5.4.	Amplifikacja markerów mikrosatelitarnych techniką PCR	42
5.5.5.	Analiza zamplifikowanych markerów mikrosatelitarnych	44
5.5.6.	Ocena utraty heterozygotyczności (LOH)	44

5.6.	Analiza statystyczna otrzymanych wyników	46
6.	Wyniki	48
6.1.	Analiza utraty heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w chromosomach 3, 11, X	48
6.2.	Analiza statystyczna	59
7.	Dyskusja	64
8.	Wnioski	73
9.	Streszczenie	75
10.	Abstract	77
11.	Literatura	79

## 1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BIC	<i>Breast Cancer Information Core</i>
bp	pary zasad ( <i>base pairs</i> )
CGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa ( <i>comparative genomic hybridization</i> )
DHPLC	denaturacyjna wysokosprawnościowa chromatografia cieczowa ( <i>denaturing high performance liquid chromatography</i> )
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
EDTA	kwasy etylenodwuaminoczworoocetowe
F	starter sensowny
FIGO	Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa ( <i>International Federation of Gynecologists and Obstetricians</i> ); klasyfikacja stadiów zaawansowania raka jajnika.
G	stopień histologicznej złośliwości ( <i>grade</i> )
HBOC	dziedziczny rak piersi/jajnika ( <i>hereditary breast/ovarian cancer</i> )
HNPCC	dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości, zespół
Lynch II	( <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> )
HR	homologiczna rekombinacja ( <i>homologous recombination</i> )
kb	tysiąc par zasad ( <i>kilo base</i> )
LOH	utrata heterozygotyczności ( <i>loss of heterozygosity</i> )
MI	niestabilność mikrosatelitarna ( <i>microsatellite instability</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHEJ	<i>nonhomologous end-joining</i>
NI	przypadek nieinformacyjny ( <i>noninformative case</i> )
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy ( <i>polymerase chain reaction</i> )
R	starter antysensowny
r. ż.	rok życia
SSHOC	dziedziczny izolowany rak jajnika ( <i>site-specific hereditary ovarian cancer</i> )
TSG	gen supresorowy ( <i>tumor suppressor gene</i> )
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia ( <i>World Health Organization</i> )

## **2. Wstęp**

### **2.1. Zachorowalność na raka jajnika**

Rak jajnika stanowi jedno z największych zagrożeń dla życia kobiety ze strony nowotworów narządu rodnego. Wynika to głównie z dużej heterogenności biologicznej nabłonkowych nowotworów jajnika, braku charakterystycznych objawów choroby oraz trudno dostępnej lokalizacji narządowej. Nowotwór jest zazwyczaj wykrywany w zaawansowanym stadium choroby i pomimo wdrażania agresywnego leczenia chirurgicznego i chemioterapii, pięcioletnie przeżycie odnotowuje się jedynie u około 30-40% chorych (Canevari i wsp, 2006; Fields i wsp, 2006).

W Polsce rak jajnika stanowi szóstą, co do częstości przyczynę zgonów z powodu chorób nowotworowych. W 2004 roku województwo pomorskie znalazło się na II miejscu pod względem liczby zachorowań na raka jajnika a współczynnik standaryzowany, czyli liczba zachorowań przypadająca na 100 000 ludności w stosunku do populacji standardowej wynosił 12,5. Według danych zamieszczonych na stronie Centrum Onkologii ([www.onkologia.org.pl](http://www.onkologia.org.pl)) w 2004 rak jajnika stanowił czwartą co częstości przyczynę zgonów kobiet z powodu nowotworów złośliwych w Polsce. Województwo pomorskie pod względem liczby zgonów z powodu raka jajnika uplasowało się na trzecim miejscu (Wojciechowska i wsp, 2004).

### **2.2. Teorie powstawania raka jajnika**

Patogeneza raka jajnika jest zjawiskiem złożonym. W trakcie procesu kancerogenezy komórki jajnika ulegają przemianom charakterystycznym dla komórek nowotworowych, takim jak: niestabilność genetyczna, utrata zdolności do zahamowania kontaktowego, zmniejszona podatność na czynniki wzrostowe oraz zaburzenia procesu podziałów komórkowych. O złożoności zmian genetycznych zachodzących podczas rozwoju raka jajnika może świadczyć fakt, iż nawet guzy o tych samych typach histopatologicznych mogą prezentować odmienny wzór aktywacji onkogenów, jak również utraty funkcji genów supresorowych (Liu i wsp, 2002). W przeciwieństwie do innych

nowotworów, takich jak na przykład rak jelita grubego, nie zaproponowano jeszcze modelu genetycznego progresji raka jajnika.

Przez wiele lat dominowały dwie hipotezy mające na celu wyjaśnienie etiopatogenezy raka jajnika: teoria owulacji oraz teoria gonadotropinowa. W ostatnich latach zaproponowano także teorię opartą na wynikach analizy morfologicznej oraz molekularnej guzów jajnika.

### **2.2.1. Teoria owulacji (Teoria Fathalla)**

Większość nowotworów złośliwych jajnika wywodzi się z warstwy nabłonka pokrywającego ich powierzchnię. Podczas owulacji, ciągłość nabłonka zostaje przerwana prowadząc do mikrouszkodzeń, w miejscu których nabłonek jest narażony na działanie estrogenu zawartego w płynie wypełniającym pęcherzyk jajnika. W miejscu tym dochodzi do koncentracji czynników proliferacyjnych i mitogennych niezbędnych do odbudowania zniszczonej warstwy nabłonka. Uważa się, iż to czynniki wzrostu wpływają na po-owulacyjną naprawę nabłonka, a zaburzenia w ich regulacji mogą prowadzić do transformacji nowotworowej (Fathalla, 1971, Godwin i wsp, 1993, Riman i wsp, 1998).

### **2.2.2. Teoria gonadotropinowa Cramera i Welcha**

Wgłębianie się nabłonka do zrębu jajnika i zatrzymanie go w torbielkach inkluzyjnych, powstałych po owulacji może stanowić pierwsze zdarzenie podczas inicjacji procesu nowotworzenia. Następujące po nim zdarzenia takie jak różnicowanie komórek, proliferacja a w końcu transformacja nowotworowa mogą być konsekwencją zwiększonego stężenia estrogenów i ich prekursorów. Podwyższenie poziomu hormonów steroidowych może być następstwem stymulacji zrębu jajnika wysokim poziomem gonadotropin (FSH, LH) (Cramer i wsp, 1983, Cramer i wsp, 1983). Obserwacje epidemiologiczne wydają się potwierdzać tę teorię. U kobiet, u których doszło do zahamowania owulacji i zmniejszenia podstawowego stężenia hormonów gonadotropinowych na skutek

ciąż bądź stosowania antykoncepcji hormonalnej obserwuje się mniejszy odsetek zachorowań na raka jajnika (Riman i wsp, 2004).

### 2.2.3. Dualistyczny model rozwoju raka jajnika

Shih i Kurman (2003) zaproponowali dualistyczny model rozwoju raka jajnika oparty na wynikach analiz morfologicznych oraz molekularnych guzów jajnika. Według ich teorii możemy wyróżnić dwie grupy nowotworów jajnika, które różnią się ścieżką rozwoju. Do pierwszej grupy kwalifikują się guzy o niskim stopniu złośliwości histologicznej, wywodzące się z guzów o granicznej złośliwości (*borderline*), których rozwój następuje stopniowo. Raki te charakteryzują się obecnością mutacji w genach *BRAF*, *KRAS*, *β-cateniny*, *TGF-β RII* oraz mutacją bądź utratą heterozygotyczności w genie *PTEN*. W drugiej grupie znajdują się guzy o wysokim stopniu złośliwości histologicznej, których rozwój przebiega szybko i agresywnie gdyż we wczesnym stadium tworząc ogniska przerzutowe. Dla tych raków charakterystyczna jest obecność mutacji w genie *TP53*, amplifikacja i nadekspresja genów *HER2/neu* i *AKT2* oraz inaktywacja genu *p16* (Shih i wsp, 2003, Shih i wsp, 2008).

### 2.3. Dziedziczne postacie raka jajnika

Nowotwory dziedziczne stanowią 5-10% wszystkich przypadków raka jajnika a pozostałe przypadki stanowią tzw. postać raka sporadycznego. Obciążony wywiad rodzinny jest jednym z największych czynników ryzyka rozwoju raka jajnika. Prawdopodobieństwo zachorowania na raka jajnika w populacji ogólnej wynosi 1,6%, jednakże u kobiet, u których w rodzinie rak jajnika wystąpił u krewnych pierwszego stopnia ryzyko to wzrasta do 5% i rośnie wraz z liczbą zachorowań na ten nowotwór w rodzinie (Prat i wsp, 2005).

Wyróżnia się trzy główne zespoły dziedzicznego występowania raka jajnika: zespół izolowanego dziedzicznego raka jajnika (*Site-Specific Hereditary Ovarian Cancer Syndrome, SSHOC*), zespół dziedzicznego raka sutka i jajnika (*Hereditary Breast Ovarian Cancer Syndrome, HBOCS*) oraz zespół Lynch II (*Hereditary Nonpolyposus Colon Cancer Syndrome II, HNPCC*).



Zespół izolowanego raka jajnika stanowi około 10% a zespół dziedzicznego raka piersi i jajnika aż 65-75% wszystkich przypadków dziedzicznego występowania tego nowotworu. U zdecydowanej większości dziedzicznych postaci raka jajnika oraz raka gruczołu piersiowego obecne są mutacje w jednym z dwóch genów supresorowych *BRCA1* bądź *BRCA2*. Wśród raków jajnika spowodowanych mutacjami genów *BRCA*, przeważają mutacje w genie *BRCA1* (obecne u około 90% chorych). Jednakże, w niektórych doniesieniach autorzy wskazują na większy niż dotychczas sugerowano udział *BRCA2* (Huusko, 1999). Germinalne mutacje w genie *BRCA2* są częściej wykrywane wśród kobiet, które zachorowały na raka jajnika w późniejszym wieku i często nie miały obciążonego wywiadu rodzinnego (Satagopan i wsp, 2001, Struewing i wsp, 1997). Niektórych przypadków rodzinnej agregacji nowotworów jajnika nie można jednak wytłumaczyć obecnością mutacji w genach *BRCA1/2*, dlatego też sugeruje się istnienie jeszcze innych genów lub czynników środowiskowych zaangażowanych w proces karcynogenezy.

W zespole Lynch II obserwuje się przypadki raka jelita grubego, endometrium, moczowodu, nerki i żołądka, a u 10-15% chorych rozwija się rak jajnika. Zespół ten związany jest z mutacjami w genach mutatorowych (MMR-*mismatch repair genes*): *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, oraz *PMS1* i *PMS2*. Zaburzenie bądź utrata funkcji tych genów prowadzi upośledzenia mechanizmów kontroli wierności replikacji oraz zaburzenia naprawy uszkodzeń DNA co w konsekwencji prowadzi do rozwoju nowotworu (Stratton i wsp, 1999, Morrison i wsp, 2002).

Pozostałe przypadki dziedzicznej predyspozycji do rozwoju nowotworu jajnika, stanowią nie więcej niż 5%, a rak jajnika jest tylko jedną ze składowych i współistnieje z innymi nowotworami (Tab.1).

Tabela 1. Zespoły dziedzicznej predyspozycji do rozwoju raka jajnika.

Zespół	Gen (lokalizacja w chromosomie)	Odsetek raków (%)	Ryzyko rozwoju raka przed 70 r.ż. (%)	Rodzaj histologiczny	Inne objawy kliniczne
Zespół dziedzicznego raka sutka i jajnika (HBOCS)	<i>BRCA1</i> (17q)	65	20-50	nabłonkowy (typ surowiczy)	rak piersi, rak jajowodów
	<i>BRCA2</i> (13q)	10	10-30		raki piersi, prostaty, trzustki, nowotwory głowy i szyi
Zespół izolowanego dziedzicznego raka jajnika (SSHOC)	<i>BRCA1</i> (17q)	10	20-50	nabłonkowy (typ surowiczy)	-
Rodzinny niepolipowaty rak jelita grubego (HNPCC)	<i>hMLH1</i> (3p) <i>hMSH2</i> (2p) <i>hMSH6</i> (2p) <i>PMS1</i> (2p) <i>PMS2</i> (7p)	5-10	≤10	nabłonkowy	raki jelita grubego, żołądka, dróg moczowych, jelita cienkiego
Zespół Peutz-Jeghersa	<i>STK11</i> (19p)	<1	<5 <sup>a</sup>	nowotwory ze sznurów płciowych i zrębu jajnika	plamy melanocytowe, polipy jelita, raki piersi, jelita grubego, trzustki, żołądka
Choroba Cowdena	<i>PTEN</i> (10q)	<1	<5 <sup>a</sup>	N/S	liczne ogniska hamartoma, raki sutka i tarczycy
Zespół nerwoidalny raka podstawnomórkowego	<i>PTCH</i> (9q)	<1	<5 <sup>a</sup>	włókniakomięsaki, różne	znamiona barwnikowe, torbiele rogowaciejące szczęki, raki podstawnomórkowe
Mnoga wrodzona chrzęstniakowatość (Choroba Olliera)	?	<<1	<5 <sup>a</sup>	ziarniszczaki	Kostniakochrzęstniakowatość, haemangiomata (naczyniaki)

N/S- nieokreślone

5<sup>a</sup>- brak jednoznacznych danych

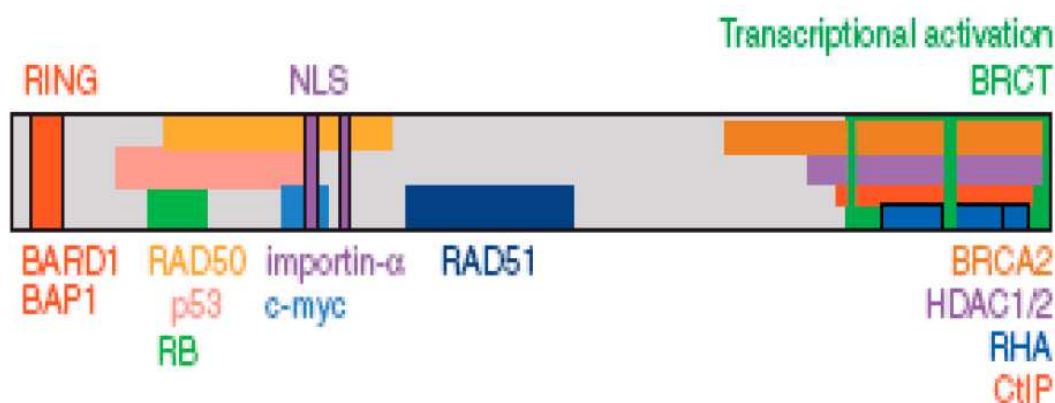
#### 2.4. Budowa i funkcja genów *BRCA1* i *BRCA2*

Badania nad rodzinnymi predyspozycjami do zachorowań na nowotwory piersi i jajnika doprowadziły do odkrycia genu *BRCA1* w 1994 roku. Połączenie analizy sprzężeń z metodą pozycyjnego klonowania pozwoliło zidentyfikować locus genu w chromosomie 17q21. W 1995 roku, odkryto drugi gen *BRCA2* predysponujący do raka piersi i jajnika, który został zlokalizowany w chromosomie 13q12. Zarówno *BRCA1* jak i *BRCA2* należą do genów supresorowych odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg rekombinacji mitotycznej, segregacji chromosomów a także zaangażowanych w procesy naprawy DNA (Limon, 2006). Mutacje w tych genach, prowadzące do skrócenia długości produktu białkowego, bądź obniżające jego aktywność, upośledzają

mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA, a tym samym prowadzą do niestabilności genomowej i wzrostu prawdopodobieństwa akumulacji uszkodzeń DNA w komórce, które mogą zainicjować proces nowotworzenia (Welch i wsp, 2000, Moller i wsp, 2007).

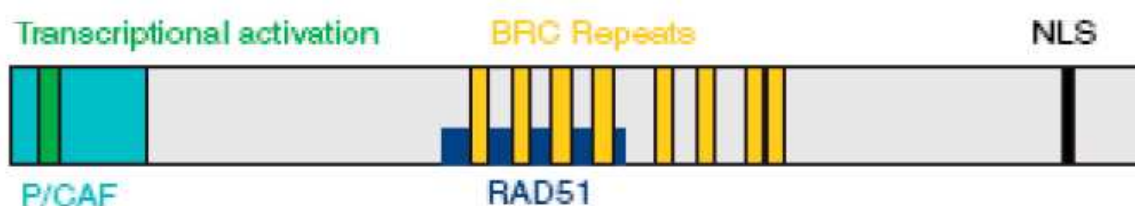
Gen *BRCA1* składa się z 24 eksonów i koduje białko o długości 1836 aminokwasów i masie 220 kDa. Na końcu 5' znajdują się dwa alternatywnie składane eksony 1a i 1b, a największy ekson 11 stanowi aż 61% sekwencji kodującej genu (3,4kb) (Ryc.1) (Scully i wsp, 2000, Welch i wsp, 2000).

**Rycina 1. Schemat budowy genu *BRCA1*** (Welch i wsp, 2000). Opis w tekście.



Transkrypt genu *BRCA1* ma długość 7,8 kb. Produktem translacji jest białko jądrowe, którego ekspresja zachodzi głównie w jądrach, tarczycy, jajniku i gruczole piersiowym. Opisano wiele alternatywnych transkryptów tego genu, które w większości stanowią pochodne delecji w obrębie eksonu 11. Najczęściej opisywane są dwa warianty: Pierwszy, *BRCA<sup>del11b</sup>* koduje białko o masie 110kDa. Ponieważ większość aminokwasów kodowanych przez ekson 11 (od 263-1365) ulega delecji, białko pozbawione zostaje sekwencji odpowiedzialnej za lokalizację w jądrze komórkowym i wykrywane jest głównie w frakcji cytoplazmatycznej. Uważa się, iż wariant ten obniża ekspresję oraz aktywność prawidłowego białka *BRCA1* i stanowi negatywny marker prognostyczny (Fraser i wsp, 2003). Drugi wariant nosi nazwę *BRCA1-IRIS* i składa się z 1399 reszt aminokwasowych. Ramka odczytu rozpoczyna się tak samo jak w przypadku pełnej długości białka *BRCA1* w eksonie drugim, natomiast kończy się w intronie 11 dodatkowymi 34 kodonami. Polipeptyd ten znajduje się w jądrze komórkowym stymulując proces replikacji DNA (EIShamy i wsp, 2004).

Gen *BRCA2* składa się z 27 eksonów kodujących białko złożone z 3418 aminokwasów o łącznej masie 384kDa. Podobnie jak *BRCA1*, gen *BRCA2* jest również dużym genem (70kb), w którym ponad 50% sekwencji kodującej znajduje się w obrębie eksonu 11. W części N-terminalnej kodowanego przez ten gen białka znajduje się domena aktywacji transkrypcji, w centralnej jego części jest zlokalizowanych osiem kopii powtórzeń BRC, a w C-terminalnej części znajduje się sekwencja NLS (*nuclear localization signals*- NLS) (Ryc. 2) (Welch i wsp, 2000).



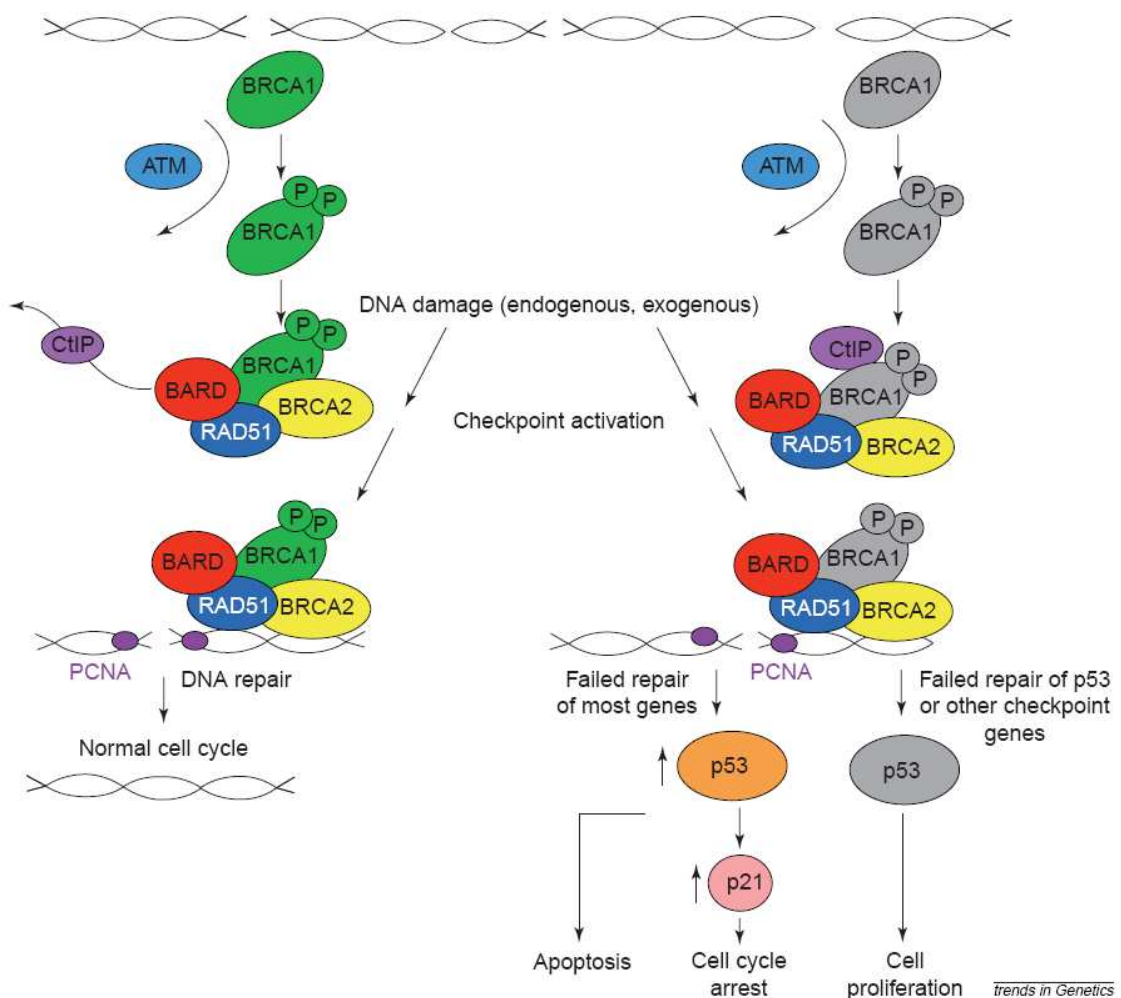
**Rycina 2. Schemat budowy genu *BRCA2*** (Welch i wsp, 2000). Opis w tekście.

W prawidłowych komórkach, *BRCA2* jest białkiem jądrowym, ulegającym głównie ekspresji w fazie G1/S. Transkrypty *BRCA2* podobnie jak *BRCA1* obecne są w gruczole piersiowym i tarczycy oraz na nieco niższym poziomie w tkance płucnej, jajniku oraz śledzionie (Bertwistle i wsp, 1998, Kim i wsp, 2003).

Kluczową rolą białek *BRCA1* i *BRCA2* jest utrzymanie stabilności genomu poprzez udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA (DSB) na drodze rekombinacji homologicznej (HR) bądź niehomologicznego łączenia końców (NHEJ). Dla komórki najbardziej korzystna jest naprawa uszkodzeń DNA poprzez homologiczną rekombinację, jednakże w przypadku, gdy jest to niemożliwe włączane są inne mechanizmy naprawcze takie jak NHEJ (*nonhomologous end-joining*) i SSA (*single-strand annealing*). Niestety w przeciwieństwie do HR, mechanizmy te obarczone są ryzykiem generacji błędów prowadzących do translokacji i delecji chromosomowych. Wydaje się, iż główną rolę w tym procesie gra białko *BRCA2*, które wchodzi w interakcję z białkiem *RAD51*, bez którego naprawa DNA na drodze homologicznej rekombinacji jest niemożliwa. *BRCA2* wiąże się z białkiem *RAD51* w domenie zawierającej powtórzenia BRC, dzięki temu białko *RAD51* może zostać wprowadzone do jądra komórkowego, w którym łączy się z ssDNA, tworząc

nukleoproteinowe włókno. Włókno to, łącząc się z homologicznymi dupleksami DNA, zainicjuje wymianę nici pomiędzy sparowanymi cząsteczkami DNA. Podczas tego procesu rola białka BRCA1 polega na koordynacji całego procesu, przekazywaniu informacji pomiędzy systemami zaangażowanymi w wykrywanie i naprawę uszkodzeń DNA. Wiadomo, iż BRCA1 wcześniej migruje do miejsca uszkodzenia, gdzie poprzez interakcję z kompleksem N/M/R (NBS1/MRE11/RAD50) stabilizuje fragmenty ssDNA (Pierce i wsp, 2001, Wang i wsp, 2000, Wang i wsp, 2000, Welch i wsp, 2000).

**Rycina 3. Rola białek BRCA1 i BRCA2 w naprawie uszkodzeń DNA** (Welch i wsp, 2000). Opis w tekście.



BRCA1/2 biorą również udział w naprawie uszkodzeń DNA powstałych na skutek działania reaktywnych form tlenu (naprawa sprzężona z translacją).

Już w kilka minut po uszkodzeniu DNA, BRCA1 wraz z białkiem histonowym H2AX uruchamiają procesy naprawcze poprzez reorganizację struktury chromatyny w miejscu jej uszkodzenia (Welch i wsp, 2000).

Białko BRCA1 jest zaangażowane także w regulację transkrypcji niektórych genów aktywowanych w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. C-terminalna domena białka BRCA1 tworzy kompleksy z polimerazą RNAII poprzez oddziaływanie z helikazą A stając się częścią holoenzymu. W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* zaobserwowano, iż BRCA1 będąc częścią holoenzymu polimerazy RNA pełni rolę białka „pomostowego” łączącego ścieżki naprawy DNA oraz odpowiedzi na stres w celu uzyskania specyficznej odpowiedzi komórki takiej jak areszt cyklu komórkowego lub apoptoza. Udział białka BRCA2 w tym procesie nie jest tak ewidentny jak BRCA1, prawdopodobnie białko to oddziałuje z białkiem EMSY zaangażowanym w negatywną regulację transkrypcji (Welch i wsp, 2000, Wang i wsp, 2000).

BRCA1 jest również składnikiem kompleksu BASC (*BRCA1 associated surveillance complex*), który wraz z innymi białkami supresorowymi, pełni rolę „koordynatora” organizującego pozostałe białka kompleksu (Scully i wsp, 2000, Welch i wsp, 2000, Wang i wsp, 2000, Stracker i wsp, 2004). Białko to wchodzi także w interakcję z heterodimerem MSH2-MSH6, co wskazywałoby na udział BRCA1 także w procesach „*mismatch repair*” (Welch i wsp, 2000).

#### 2.4.1. Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2*

Jak dotąd w genie *BRCA1* opisano ponad 600 różnych mutacji punktowych (*Breast Cancer Information Core: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>*). Większość z nich to mutacje prowadzące do zmiany ramki odczytu lub mutacje nonsensowne, których efektem jest przedwczesna terminacja translacji i powstanie skróconego białka. W tej samej bazie opisano około 250 mutacji w genie *BRCA2*. Większość opisywanych zmian stanowią, podobnie jak w przypadku *BRCA1*, mutacje prowadzące do powstania skróconej formy białka.

Nosiciele germinalnych mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka zachorowania na raka piersi i jajnika. Częstość występowania heterozygotycznego nosicielstwa mutacji w większości populacji wynosi około 0,12% czyli 1/800. Jednakże w populacjach izolowanych

geograficznie lub kulturowo, nosicielstwo określonych mutacji może być wyższe. Zjawisko to nosi nazwę „efektu założyciela” i można je zaobserwować wśród Żydów Aszkenazyjskich, u których nosicielstwo trzech mutacji założycielskich (*BRCA1* 185delAG, 5382insC oraz *BRCA2* 6174delT) jest bardzo częste i odpowiada aż za 60% wszystkich przypadków raka jajnika (Kasprzak i wsp, 2005, Huusko 1999).

W populacji islandzkiej, która jest bardzo homogenna genetycznie, efekt założyciela możemy zaobserwować w przypadku mutacji 999del5 w genie *BRCA2*. Około 0,6% Islandczyków jest nosicielami tej mutacji i odpowiada ona za około 40% przypadków raków piersi u mężczyzn oraz 8% raków jajnika i piersi u kobiet (Huusko 1999, Sarantaus i wsp, 2000, Tryggvadottir i wsp, 2006).

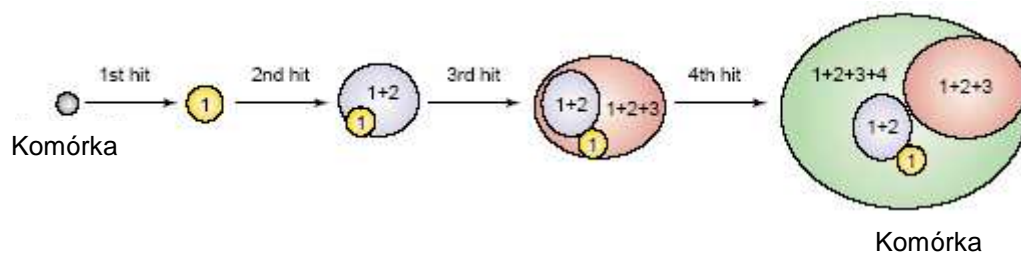
W populacji polskiej, podobnie jak w populacjach Litwy, Niemiec i Rosji za mutacje założycielskie uważa się: 5382insC w eksonie 20 oraz Cys61Gly w eksonie 5 w genie *BRCA1*. Inne powtarzające się w populacji polskiej mutacje *BRCA1* to: 185delAG, 3819del5, 4153delA (Majdak i wsp, 2005, Perkowska 2003, Górski i wsp, 2000).

## 2.5. Teoria Knudsona

Ponad trzydzieści lat temu Alfred Knudson, opierając się na obserwacji chorych na siatkówczaka złośliwego, sformułował hipotezę tłumaczącą proces nowotworzenia. Siatkówczak złośliwy występuje w dwóch formach: dziedzicznej oraz sporadycznej. W przypadku rodzinnego/dziedzicznego występowania siatkówczaka, guz rozwija się we wczesnym dzieciństwie, często w obu gałkach ocznych. Natomiast postać sporadyczna tego nowotworu rozwija się znacznie później, najczęściej w jednej gałce ocznej. Za wystąpienie tego nowotworu odpowiedzialne są mutacje w genie supresorowym *RB1* zlokalizowanym w chromosomie 13q14. Aby doszło do rozwoju guza nowotworowego musi dojść do utraty obu alleli tego genu. Osoby, u których wystąpiła dziedziczna postać nowotworu dziedziczą jeden zmutowany allel, dlatego też istnieje większe prawdopodobieństwo, że dojdzie u nich do drugiej mutacji w prawidłowej kopii genu,. Natomiast w sporadycznej formie siatkówczaka dochodzi do dwóch niezależnych mutacji w tym samym genie. Prawdopodobieństwo takiego

zjawiska jest bardzo małe i wymaga dłuższego okresu czasu, dlatego też sporadyczna forma siatkówczaka zazwyczaj występuje w późniejszym wieku (Devilee i wsp, 2001, Limon, 2006).

Teoria ta nie tylko sprawdza się w przypadku siatkówczaka, ale także innych nowotworów. Wyjaśnia także, dlaczego raki dziedziczne zazwyczaj rozwijają się w młodszy wiek i w przypadku niektórych nowotworów np. raka piersi czy jajnika występują bilateralnie lub/i wieloogniskowo (Devilee i wsp, 2001, Limon, 2006).

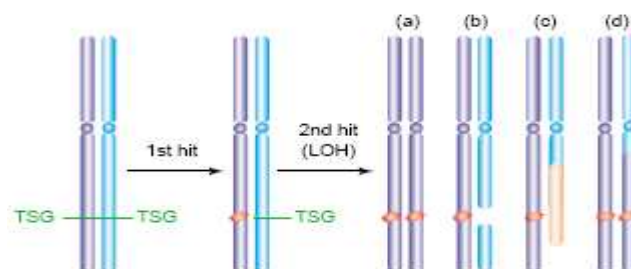


**Rycina 4. Schemat akumulacji błędów w materiale genetycznym prowadzących do rozwoju nowotworu** (Devilee i wsp, 2001) Proces inicjacji nowotworowej rozpoczyna się od mutacji w pojedynczej komórce. W czasie kolejnych podziałów komórkowych mutacja ta przekazywana jest komórkom potomnym. Dochodzi do kolejnych zmian w materiale genetycznym, które to powodują, iż komórki nabierają nowych właściwości charakterystycznych dla komórek nowotworowych (np. niestabilność genetyczna zaburzenia procesu podziałów komórkowych).

## 2.6. Technika LOH

Mechanizmy powodujące utratę jednego z alleli takie jak: delecje fragmentów chromosomów, rekombinacja mitotyczna czy też nondysjunkcja w procesie mitozy – prowadzą do utraty heterozygotyczności (LOH). Analiza utraty heterozygotyczności („*loss of heterozygosity*”, LOH) pozwala na określenie ubytków od kilkuset do kilkudziesięciu tysięcy par zasad. Delecja badanego odcinka DNA, manifestująca się utratą heterozygotyczności polimorficznego allela markerowego, może wskazywać na utratę hipotetycznego genu supresorowego (Devilee i wsp, 2001).

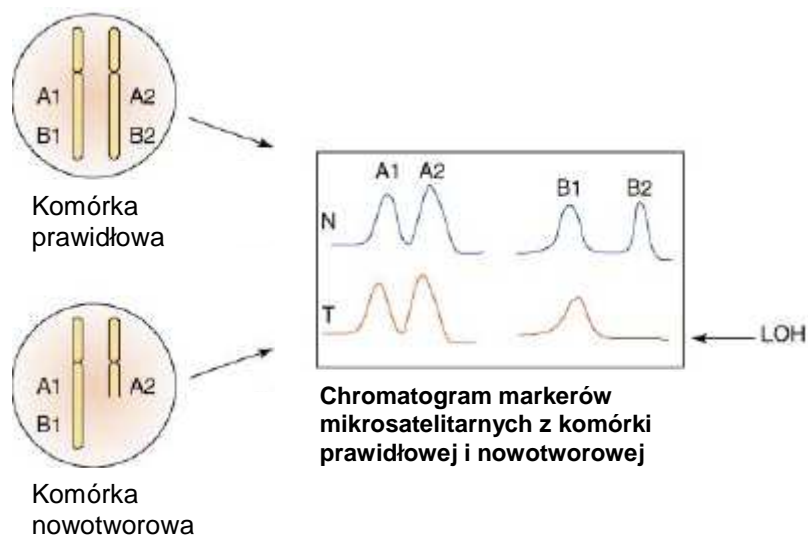




### Rycina 5. Inaktywacja genów supresorowych według modelu Knudsona

(Devilee i wsp, 2001). I mutacja zazwyczaj powstaje przypadkowo, do utraty funkcji drugiego allele (LOH) prowadzą: a) nondysjunkcja wraz z reduplikacją zmutowanego allele, b) delecja w obrębie chromosomu c) translokacja nie zrównoważona, d) rekombinacja mitotyczna (TSG-tumor suppressor gene).

Dzięki zastosowaniu gęstej siatki polimorficznych markerów mikrosatelitarnych możliwe stało się stworzenie map regionów chromosomowych, których utrata jest charakterystyczna dla danego typu nowotworu. Połączenie analizy LOH wraz z techniką CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*) sprawia, iż wzory te stają się jeszcze bardziej dokładne. Wykorzystanie zjawiska LOH oraz np. analizy mikromacierzy pozwala nawet, według niektórych autorów, na klasyfikację podtypów guzów (Zhou i wsp, 2005, Liu i wsp, 2002).



### Rycina 6. Schemat chromatogramu utraty heterozygotyczności (Liu i wsp,

2002). A1/A2 i B1/B2 reprezentują dwa odrębne polimorficzne *loci*. Na schemacie chromatogramu przedstawiona jest utrata (LOH) allele B2.

Wyniki dotychczas opublikowanych prac, w których wykorzystano technikę LOH do analizy nowotworów jajnika, wskazują na istnienie jeszcze wielu potencjalnych genów supresorowych, których udział w patogenezie należałoby zweryfikować. Należy sądzić, że wykrycie charakterystycznych miejsc utraty heterozygotyczności w raku jajnika umożliwi identyfikację nieznanego jeszcze genu supresorowego, a poznanie jego produktu białkowego pozwoli zrozumieć patogenezę i etiologię raka jajnika.

### **2.6.1. Sekwencje markerowe stosowane w LOH**

Sekwencje markerowe stosowane w technice LOH powinny charakteryzować się wysoką heterozygotycznością oraz powszechnością występowania w genomie. Ponieważ niewiele sekwencji spełnia takie wymogi, do najczęściej stosowanych należą sekwencje RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), sekwencje mikrosatelitarne oraz SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu). Niestety markery RFLP charakteryzują się stosunkowo niską heterozygotycznością w porównaniu do pozostałych. Często sekwencje te nie sąsiadują z genami utrudniając identyfikację potencjalnych genów supresorowych (Koreth i wsp, 1996). Markery mikrosatelitarne, czyli tandemowe powtórzenia 2-5 nukleotydów są bardzo powszechne w genomie człowieka. Jako odcinki niekodujące ulokowane są zazwyczaj w intronach jednak czasami znajdujemy je również w eksonach w postaci mniejszej liczby powtórzeń. Dzięki dużemu zróżnicowaniu liczby powtórzeń motywu podstawowego jego polimorfizm jest ogromny i wynosi przeciętnie 80% (Koreth i wsp, 1996, Naidoo i wsp, 1998, Bayani i wsp, 2002). Sekwencje SNP stanowią najliczniejszą grupę polimorfizmów - do dnia dzisiejszego zidentyfikowano ponad dwa miliony takich sekwencji. Ponieważ wykazują równomiernie rozmieszczone w genomie oraz są bardzo stabilne, dlatego też powoli wypierają pozostałe typy markerów w badaniach molekularnych (Zhou i wsp, 2005).

### **2.6.2. Metody stosowane w badaniu utraty heterozygotyczności**

W zależności od rodzaju wybranych sekwencji markerowych oraz celu pracy dysponujemy ograniczonym wyborem metod z zakresu biologii molekularnej, które można zastosować do badania utraty heterozygotyczności. Do niedawna do najczęściej stosowanych metod w badaniu utraty heterozygotyczności należało RFLP, ponieważ jednak jest to metoda bardzo praco- i czasochłonna powoli zostaje wypierana przez inne nowocześniejsze metody. Dodatkowym ograniczeniem tej metody są również nieliczne sekwencje zawierające miejsce cięcia dla enzymów restrykcyjnych obecne głównie w okolicach telomerowych (Koreth i wsp, 1996). Analizę utraty heterozygotyczności można również przeprowadzić z zastosowaniem standardowej reakcji PCR, podczas której zamplifikowane zostaną sekwencje mikrosatelitarne. W takim przypadku detekcja LOH może się odbyć po uprzednim przeprowadzeniu elektroforezy agarozowej bądź poliakrylamidowej i wybarwieniu produktu PCR. Do wizualizacji LOH w żelu można zastosować bromek etydydy lub azotan srebra. Bardzo często używa się starterów znakowanych na końcach 5' znacznikami fluorescencyjnymi, dzięki temu produkt reakcji PCR jest w łatwy sposób wykrywany po przeprowadzeniu elektroforezy kapilarnej, a do oceny LOH służy program komputerowy (Naidoo i wsp, 1998, Christensen i wsp, 1999).

### **2.6.3. Utraty heterozygotyczności w raku jajnika**

Technika LOH przyczyniła się do zidentyfikowania wielu potencjalnych genów supresorowych, wśród których być może znajdują się geny odgrywające kluczową rolę w patogenezie raka jajnika.

Dotychczas ukazało się około 300 prac, w których opisano utraty heterozygotyczności, głównie w sporadycznych przypadkach nowotworów jajnika. W pracach tych badano od kilku do kilkunastu, rzadziej kilkudziesięciu regionów chromosomowych. Omówione poniżej wyniki analiz LOH dotyczą tylko nowotworów złośliwych jajnika. W przypadku chromosomu 1, częste utraty heterozygotyczności obserwuje się w ramionach krótkich tego chromosomu -

1p31 i 1p36. W prążku p31 zlokalizowano gen *ARH1* (*NOEY2*), należący do onkogenów z rodziny *ras*, będący negatywnym regulatorem wzrostu komórkowego poprzez hamowanie aktywności promotora cykliny D1 i indukcję p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Liu i wsp, 2002, Yu i wsp, 1999). Z prążka 1p36 wyizolowano gen *p73*, homolog TP53, będący kandydatem na gen supresorowy, jednakże dalsze badania nie potwierdziły tych przypuszczeń (Liu i wsp, 2002, Imyanitov i wsp, 1999).

Utrata heterozygotyczności angażująca różne regiony z ramion krótkich chromosomu 3 opisywana jest w wielu sporadycznych nowotworach takich jak: raki płuc, piersi, nerki czy guzy głowy i szyi (Zabarovsky i wsp, 2002, Kwong i wsp, 2006). LOH w obrębie ramion krótkich chromosomu 3 są częstym zjawiskiem w nowotworach jajnika. Częstość LOH waha się od 38-57% guzów w zależności od badanego regionu tego chromosomu. Taka wysoka częstość utrat sugeruje obecność nie znanych jeszcze genów supresorowych zaangażowanych w rozwój raka jajnika. Jako potencjalne lokalizacje nowych genów supresorowych wskazuje się 3p12-p13, 3p14.2, 3p21-p22, 3p24-p25 oraz 3p25-26. Wiadomo, że w 3p14.2 oraz 3p25 znajdują się już dwa znane geny supresorowe *FHIT* oraz *VHL*, jednakże są one sporadycznie inaktywowane w raku jajnika i nie odgrywają znaczącej roli w jego patogenezie (Fullwood i wsp, 1999). W prążku 3p21.3 odkryto gen *RASSF1A* będący kandydatem na gen supresorowy, który jest wyciszany epigenetycznie w 40% raków jajnika (Kwong i wsp, 2006, Fullwood i wsp, 1999).

Zjawisko LOH często (46%) odnotowywane jest w długich ramionach chromosomu 5, dlatego też w kręgu zainteresowań znalazł się gen *APC* (5q21-22). W guzach, które wykazywały LOH w *locus* 5q21-22 przeprowadzono analizę mutacji *APC* - ponieważ nie wykryto żadnych zmian, nie potwierdziły się przypuszczenia o roli tego genu w patogenezie raka jajnika (Tavassoli i wsp, 1996). W przeciwieństwie do ramion długich chromosomu 5, w ramionach krótkich dochodzi rzadko do utrat, mimo to właśnie tam zlokalizowano gen supresorowy *Dab2/DOC2* (5p13). Gen ten pełni rolę negatywnego regulatora *Ras*-zależnego wzrostu komórkowego. Ekspresja *Dab2* jest wygaszana w 80% guzów jajnika i uważana jest za wczesną zmianę w onkogenezie raka jajnika (Cody i wsp, 2007, Liu i wsp, 2002, Xu i wsp, 1998, Fazili i wsp, 1999).

Utraty heterozygotyczności w obrębie długich ramion chromosomu 6 obserwowane są we wszystkich typach nabłonkowych raków jajnika. Szczególnie interesujące są regiony 6q21-23, 6q25 i 6q27 gdzie odnotowano najwięcej utrat. W jednym z tych regionów, w prążku 6q25, zidentyfikowano gen *LOT1*. Gen ten należy do rodziny *PLAG*, genów kodujących czynniki transkrypcyjne zawierające motyw palca cynkowego. *LOT1* podlega matczynemu imprintingowi a jego ekspresja jest wyciszana w komórkach nowotworowych poprzez mechanizm LOH lub delecję homozygotyczną, bądź też epigenetycznie przez hipermetylację promotora i deacetylację histonów (Abdollahi, 2007, Liu i wsp, 2002, Abdollahi i wsp, 1999).

W chromosomie 9p21 zidentyfikowano gen *CDKN2A* (*p16*, *MTS1*) kodujący białko zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego. W badaniach immunohistochemicznych zaobserwowano znacznie podwyższony poziom białka p16 w guzach surowicznych o wysokim stopniu złośliwości histologicznej w porównaniu do guzów surowicznych o niższym stopniu złośliwości, czy też nowotworów o granicznej złośliwości. Obserwacje te wydają się potwierdzać dualistyczną teorię rozwoju nowotworów jajnika (O'Neill i wsp, 2007, Liu i wsp, 2002).

Gen *PTEN*, zlokalizowany w 10q23, jest znanym genem supresorowym, którego mutacje wykrywa się w wielu nowotworach, takich jak: glejaki, rak prostaty, nowotwory nerek oraz czerniak złośliwy skóry (Li i wsp, 1997). W przypadku raków jajnika, mutacje tego genu są wykrywane w około 20% rakach endometrioidalnych. Utraty heterozygotyczności w prążku 10q23 obecne są w 43% guzów endometrioidalnych i w około 30% raków jasnokomórkowych jajnika. Ponieważ LOH oraz mutacje genu *PTEN* można wykryć już w cystach endometrioidalnych, uważa się, iż są to wczesne zmiany na drodze karcynogenezy raka endometrioidalnego (Obata i wsp, 1998, Kurose i wsp, 2001, An i wsp, 2007).

Analiza LOH krótkich ramion chromosomu 11 wskazała dwa regiony chromosomowe często ulegające utratom. W prążkach 11p13 oraz 11p15, w których obserwuje się LOH, zlokalizowane są dwa geny supresorowe: *WT1* oraz *TSG10*. Rola tych genów w onkogenezie raka jajnika nie została jeszcze dokładnie określona. Wyniki ostatnich badań wskazują, iż ekspresja genu *WT1* w komórkach nowotworowych jajnika prawdopodobnie sprzyja progresji guza

(Yamamoto i wsp, 2007, Hodgal i wsp, 2007, Mahata i wsp, 2006). Na ramionach długich chromosomu 11 również możemy wyróżnić dwa regiony wyróżniające się pod względem liczby utrat – 11q22-23 i 11q23.3-24.3. W prążku 11q23 znajduje się *locus* genu *ATM*, nieco dalej w prążku 11q25, znajduje się drugi gen *BRAX2* (Lavin, 1999, Sellar i wsp, 2001). Pomimo częstych utrat (44%) w prążku 11q23 w sekwencji genu *ATM* nie zaobserwowano żadnych zmian (Koike i wsp, 1999). Niewiadomo czy liczne LOH w 11q25 związane są z delecjami w genie *BRAX2*, czy być może w tym regionie znajdują się nieznane jeszcze geny supresorowe.

Utraty długich ramion chromosomu 13 są często opisywane w rakach jajnika, szczególnie w guzach o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego (Sato i wsp, 1991, Kim i wsp, 1994). Wysoką częstość LOH zaobserwowano w prążku 13q12-13 będącym *locus* genu *BRCA2*, jednakże mutacje tego genu w sporadycznych rakach jajnika są bardzo rzadkie (Lancaster i wsp, 1996, Kim i wsp, 2005). Często tracony jest też region 13q14 w obrębie, którego znajduje się gen *RB1* - nie jest to jednak powiązane z inaktywacją tego znanego genu supresorowego. Przeprowadzono badania immunohistochemiczne raków jajnika, których wyniki jednoznacznie wykazały, iż białko RB pozostaje aktywne pomimo utraty heterozygotyczności w prążku 13q14. Autorzy tej pracy sugerują, że w tym regionie znajdują się nieznane jeszcze geny supresorowe odgrywające krytyczną rolę w patogenezie raka jajnika (Dodson i wsp, 1994).

Tabela 2. Geny supresorowe zaangażowane w patogenezę raka jajnika.

Gen	Lokalizacja w chromosomie	Funkcja
<i>ARH1</i>	1p31	negatywny regulator wzrostu komórkowego
<i>Dab2/DOC2</i>	5p13	negatywny regulator <i>Ras</i> -zależnego wzrostu komórkowego
<i>LOT1</i>	6q25	czynnik transkrypcyjny
<i>CDKN2A</i>	9p21	wiąże się z kompleksem cykliny-CDK4
<i>PTEN</i>	10q23	negatywna regulacja ścieżki sygnalizacyjnej PI3'K/PKB/Akt
<i>BRAX2</i>	11q25	czynnik transkrypcyjny pośredniczący w <i>ras/raff</i> zależnej transkrypcji
<i>BRCA2</i>	13q12	naprawa uszkodzeń DNA
<i>WWOX</i>	16q23.2	mediator apoptozy
<i>HIC-1</i>	17p13	czynnik transkrypcyjny
<i>OVCA1</i>	17p13	nieznana
<i>TP53</i>	17q13.1	czynnik transkrypcyjny, odpowiedź na uszkodzenie DNA, apoptoza, angiogeneza
<i>BRCA1</i>	17q25	naprawa uszkodzeń DNA
<i>SMAD4</i>	18q21	sygnalizacja TGF- $\beta$
<i>GPC3</i>	Xq26	regulacja oddziaływań pomiędzy czynnikami wzrostu a ich receptorami

Chromosom 16 nie posiada regionów charakteryzujących się wysoką częstością utrat w raku jajnika. Jednakże w tym chromosomie zlokalizowany gen supresorowy *WWOX* będący kandydatem na gen supresorowy (Hezova i wsp, 2007). Częstość utrat w prążku 16q23.2 w którym znajduje się ten gen sięga 34% guzów jajnika. Prawdopodobnie brak ekspresji białka *WWOX* związany jest z niekorzystnym przebiegiem choroby (Paige i wsp, 2001, Nunez i wsp, 2005).

Utraty ramion krótkich (53%) jak i długich (57%) chromosomu 17 są często opisywane w literaturze (Presneau i wsp, 2005, Eccles i wsp, 1990, Wertheim i wsp, 1996). W ramionach krótkich 17p13.1 znajduje się znany gen supresorowy *TP53*, a utrata bądź nieprawidłowe funkcjonowanie kodowanego przez ten gen białka p53 jest jedną z najczęstszych nieprawidłowości występujących w komórkach nowotworowych (Shelling i wsp, 1995, Katso i wsp, 1997). Bardzo częste utraty heterozygotyczności obserwuje się w prążku

13p13.3, w przeciwieństwie do utrat w *locus TP53*, zmiany te zazwyczaj wykrywane są we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu (Phillips i wsp, 1996). W locus tym znajdują się trzy geny *OVCA1*, *OVCA2* oraz *HIC-1* będące kandydatami na geny supresorowe. Prążki 17q12.2 (*locus NF1*), 17q21 (wraz z *locus BRCA1*) oraz 17q25.1-17qter to obszary genomu znajdujące się w długich ramionach chromosomu 17, w których zjawisko LOH występuje najczęściej.

Utraty heterozygotyczności w obrębie długich ramion chromosomu 18 występują w raku jajnika z częstością średnio 42% (Zborovskaya i wsp, 1999). Utraty w prążku 18q23 pomiędzy markerami D18S5 i D18S11 wykrywane są głównie w zaawansowanych stadiach rozwoju nowotworu, będąc prawdopodobnie późnym wydarzeniem w procesie progresji guza (Chenevix-Trench i wsp, 1997).

W obrębie chromosomu X utraty heterozygotyczności występują z tą samą prawie częstością w obydwóch ramionach (p-38%, q-34%). Charakterystyczne jest występowanie LOH na zinaktywowanym chromosomie X. Utraty w regionie Xq11-12 oraz markera DXS454 (Xq21-q23) wydają się korelować w pierwotnych rakach surowicznych jajnika z krótszym czasem przeżycia chorych (Choi i wsp, 1997, Choi i wsp, 1997, Hodgall i wsp, 2004). W prążku Xq26 zlokalizowany jest gen *GPC3*, którego ekspresję możemy obserwować w prawidłowych tkankach płuc, nerek oraz jajników (Filmus, 2001). Inaktywacja *GPC3* w guzach jajnika może sugerować jego supresorową rolę (Pilia i wsp, 1996, Lin i wsp, 1999, Stadlmann i wsp, 2007).

W piśmiennictwie jest niewiele prac, w których analiza utraty heterozygotyczności była przeprowadzona na dużej liczbie chorych. W większości publikacji badania prowadzone są na niewielkiej grupie kobiet z rakiem jajnika, a otrzymane w ten sposób wyniki wydają się być przypadkowe.

W niniejszej rozprawie przeprowadzono analizę utraty heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w chromosomach 3, 11 oraz chromosomie X w guzach raka jajnika. Wybór polimorficznych markerów mikrosatelitarnych oparto na dostępnych źródłach literaturowych, wybierając regiony charakteryzujące się częstymi utratami heterozygotyczności. Szukano związku pomiędzy utratami heterozygotyczności w wybranych loci a parametrami klinicznymi nowotworów, a także różnic we wzorze LOH pomiędzy



pacjentkami będącymi nosicielkami germinalnych mutacji w genach *BRCA1/2* a chorymi bez mutacji.

### **3. CELE PRACY**

1. Analiza częstości występowania utraty heterozygotyczności (LOH) wybranych polimorficznych markerów mikrosatelitarnych z chromosomów 3, 11, X w guzach nieselekcjonowanych raków jajnika.
2. Ocena związku pomiędzy występowaniem zjawiska LOH w guzie nowotworowym a wybranymi parametrami histopatologicznymi i klinicznymi w grupie chorych kobiet z rakiem jajnika ze szczególnym uwzględnieniem pacjentek z mutacjami germinalnymi genów *BRCA1/2*.
3. Analiza porównawcza częstości LOH w guzach raka jajnika w grupach pacjentek ze sporadyczną oraz dziedziczną postacią tego raka.

#### 4. MATERIAŁ

Materiał do badań stanowił DNA wyizolowany z krwi obwodowej oraz tkanki nowotworowej guzów w grupie 165 pacjentek z nieselekcjonowanym rakiem jajnika. Pacjentki z rozpoznaniem raka jajnika operowane były w latach 1992-2004 w Klinice Ginekologii, Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiety, AM w Gdańsku (Kierownik: Prof. dr hab. med. Janusz Emerich). Od każdej pacjentki pobierano 10 ml krwi żyłnej na EDTA. Fragmenty guza zawierające makroskopowo tylko tkankę nowotworową z pierwotnego ogniska były pobierane podczas pierwotnego zabiegu operacyjnego i natychmiast mrożone w ciekłym azocie. Do badanej grupy włączano tylko pacjentki z pewnym rozpoznaniem histopatologicznym raka jajnika. Wszystkie włączone do badanej grupy pacjentki wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniach genetycznych.

U wszystkich pacjentek, w ramach wcześniejszych projektów badawczych, została przeprowadzona analiza pięciu najczęstszych germinalnych mutacji w genie *BRCA1* (185delAG, 300T/G, 3819del5, 4153delA oraz 5382insC) oraz eksonów 10 i 11 genu *BRCA2*. Aby zwiększyć w badanej grupie pulę pacjentek będących nosicielkami mutacji w genie *BRCA1* (Tab. 3), dołączono cztery przypadki chorych na raka jajnika ze znaną mutacją wykryte w tym samym czasie w Pracowni Molekularnej Katedry Biologii i Genetyki AM w Gdańsku. Od pacjentek zabezpieczono próbki DNA wykorzystywane podczas diagnostyki mutacji oraz fragmenty tkanek guza zatopione w bloczkach parafinowych pochodzące z Samodzielnej Pracowni Patomorfologii Klinicznej, Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiety AMG (Kierownik: Prof. dr hab. med. Maria Hrabowska).

Tabela 3. Pacjentki o znanej mutacji w genie *BRCA1* dołączone do badanej grupy

Nr przypadku	Nazwa mutacji
223	5382insC
224	185delAG
226	5382insC
227	5382insC

#### 4.1. Dane kliniczne badanych pacjentów

W tab. 4 znajdują się dane kliniczne badanej grupy kobiet. Średnia wieku pacjentek wynosiła  $57 \pm 12,8$ . W 25 przypadkach z powodu braku kontaktu lub zgonu pacjentki, brak jest danych dotyczących wywiadu rodzinnego. W rozpoznaniu histopatologicznym guzów przeważał typ surowiczny (95 przypadków), pozostałe typy raka jajnika występowały znacznie rzadziej (endometrioidalny-16 przypadków, śluzowy-13, jasnokomórkowy-12, niezróżnicowany- 21, płaskonabłonkowy- 3 i mieszany- 4). Aby ułatwić analizę statystyczną dokonano podziału na dwie grupy ze względu na rozpoznanie histopatologiczne. W grupie 1 znalazły się wszystkie przypadki z rozpoznaniem typu surowiczego a w grupie 2 pozostałe typy raka jajnika. Wśród guzów przeważał wysoki stopień zaawansowania klinicznego i złośliwości histologicznej: FIGO IIIC (84)%, G2 (n=32, 19,4%) oraz G3 (n=33, 20%). W czterech guzach nie określono stopnia zaawansowania klinicznego ani złośliwości histologicznej. W ośmiu przypadkach brakowało danych w jednej z powyższych kategorii. W trakcie realizacji pracy w badanej grupie w 99 przypadkach odnotowano zgon jednej chorej. Podstawowe parametry kliniczne chorych zestawiono w tabeli nr 4.

Tabela 4. Zestawienie analizowanych parametrów klinicznych oraz wyników analizy molekularnej genów *BRCA1/2* 165 chorych z rakiem jajnika.

Nr	Wiek	Zgon	Przeżycie*	Wywiad	Histpat	Grade	FIGO	Mutacje*
2	64	2	12	negatywny	1	3	IIIC	-
6	45	2	13	negatywny	2	1	IIIC	-
21	58	2	9	negatywny	1	1	IIIC	-
23	42	1	48	negatywny	1	3	IIIC	+
32	74	2	7	negatywny	1	3	IIIC	-
37	55	2	32	pozytywny	1	3	IV	-
40	47	2	7		1	1	IV	-
44	39	2	55		1	2	IIIC	-
46	49	2	2		1	3	IIIC	-
47	52	2	69		1	2	IIC	-
49	41	2	62	negatywny	1	2	IIIC	-
52	35	2	1		1	2	IV	-
53	60	1	118	pozytywny	1	3	IIIC	+
56	45	2	102	pozytywny	1	3	IV	-
58	76	2	0	negatywny	1	2	IIIC	-
60	62	2	17	pozytywny	1	2	IIIC	-
63	60	2	20		1	1	IC	-
65	64	2	19	pozytywny	1	2	IIIC	+
66	63	2	6		1	3	IV	-
68	71	2	24	negatywny	1	3	IV	-
69	47	2	15		2	2	IA	-
72	45	2	18		1	3	IIIB	-
73	44	2	73		1	2	IIIC	-
74	45	2	19	pozytywny	1	2	IA	+
76	52	2	25		1	3	IIIC	-
77	59	1	160		2	1	IA	-
82	64	2	43		1	2	IV	-
84	56	1	136	pozytywny	1	2	IA	+
85	73	2	0	negatywny	2	3	IIIC	-
90	60	2	7	pozytywny	2	2	IIIB	-
92	43	2	41	pozytywny	1	2	IV	+
93	76	2	19		1	3	IIIC	+
94	86	2	15		2	3	IIIC	-
95	44	2	39		1	2	IIIC	-
96	55	2	0		1	2	IV	-
97	72	2	8	negatywny	1	2	IIIC	-
99	37	2	1	negatywny	1	3	IV	-
100	45	2	51	pozytywny	1	2	IIIC	+
102	32	1	108		2	3	IIIC	-
104	67	2	9	negatywny	1	2	IV	-
108	41	2	10	negatywny	2	1	IIIC	-
110	79	2	10	pozytywny	1	2	IIIC	-
111	72	2	19	negatywny	2	2	IIIC	-
112	32	2	30	pozytywny	1	3	IIIB	-
113	48	2	66	pozytywny	1	3	IIIC	-
115	58	1	50	negatywny	2	3	IIIC	-
118	79	2	35	negatywny	1	3	IIIC	-
120	52	2	77	negatywny	1		IIIC	-
121	52	1	29		2	3	IIC	+
122	51	1	41	negatywny	2	1	IC	-
124	47	2	38	negatywny	2			-
125	50	1	106	negatywny	2	3	IIIC	+
126	60	2	0	pozytywny	2	1	IIIC	-
127	47	1	43	negatywny	2	3	IIIB	-
128	54	2	23	negatywny	1	3	IIIC	-
129	74	2	32	negatywny	1	2	IIIC	-
131	75	2	12	negatywny	1	3	IIIC	-

Nr	Wiek	Zgon	Przeżycie*	Wywiad	Histpat	Grade	FIGO	Mutacje*
132	71	2	21	negatywny	2	3	IIIC	-
133	51	2	46	negatywny	1	1	IIIC	-
134	56	1	37	negatywny	1	3	IIIC	-
135	55	2	16	negatywny	1	1	IIIC	-
136	74	1	27	negatywny	1	2	IIIC	-
137	62	2	17	negatywny	1	1	IIIC	-
138	68	1	37	negatywny	2	2	IIIA	-
139	56	2	9	negatywny	2	1	IIIC	-
141	73	1	37	negatywny	1	3	I	-
144	20	2	9	negatywny	2	2	IB	-
145	53	1	41	negatywny	1	3	IIIC	-
150	56	2	0		2	3	IIIC	-
152	66	2	33	pozytywny	1	2	IIIC	+
153	54	2	15	pozytywny	2		IV	+
155	51	2	34	negatywny	2	2	IIIC	-
157	37	2	20	negatywny	1	2	IIIC	+
158	40	1	42	negatywny	2	3	IC	-
159	76	2	13	negatywny	1	2	IIIC	-
160	51	2	27		1	1	IIIC/B	-
161	41	1	33	negatywny	2	3	IIIB	+
165	58	2	14	negatywny	1	2	IIIC	-
166	53	2	38	negatywny	2	3	IIIC	-
167	77	2	0	negatywny	1	1	IIIC	-
169	48	1	35	negatywny	2	2	IIC	-
170	78	2	17	pozytywny	1	1	IIIC	-
171	82	2	6	pozytywny	2	2	IIIC	-
172	55	1	26	negatywny	1	2	IIIC	-
173	58	1	35	negatywny	2	2	IC	-
175	62	2	19	negatywny	2		IIIC	-
176	61	2	65	negatywny	2		IA	-
177	47	1	33	negatywny	2	2	IIIB	-
179	66	1	34	negatywny	2	3	IV	-
180	41	1	35	negatywny	2	1	IC	-
181	51	1	34	negatywny	1	1	IB	-
182	73	2	26	negatywny	2	3	IV	-
183	56	2	17	pozytywny	1	3	IV	+
184	65	2	0		2	3	IIIC	-
185	46	2	1	negatywny	2	1	IV	-
186	65	1	34	negatywny	2	3	IA	-
187	46	1	23	negatywny	1	2	IIIC	-
189	62	1	30	negatywny	2	3	IIIC	+
190	54	1	20	negatywny	2	3	IIB	-
191	48	2	1	negatywny	1	2	IIIC	-
192	67	2	26	negatywny	1	3	IV	-
194	67	1	29	negatywny	1	3	IIIB	-
195	54	1	30	negatywny	1	2	IIB	-
196	35	1	19	pozytywny	1	3	IIIC	-
197	53	1	31	negatywny	2	1	IIIC	-
198	72	2	23	negatywny	2	3	IIIC	-
199	46	1	34	negatywny	2	2	IIIC	+
200	73	2	7	negatywny	1	3	IV	-
201	52	1	34	pozytywny	2	3	IV	+
203	55	2	11	negatywny	2	1	IIIC	-
204	27	2	9	pozytywny	2	2	IV	-
205	52	2	24	negatywny	2	3	IIIC	-
206	71	2	21	negatywny	1	2	IIIB	-
208	62	2	16	negatywny	1	2	IIIB	-

Nr	Wiek	Zgon	Przeżycie*	Wywiad	Histpat	Grade	FIGO	Mutacje*
209	74	2	34	negatywny	2	1	IIIC	-
211	82	1	29	pozytywny	1	2	IIIA	-
212	54	1	30	pozytywny	1	2	IIIC	+
213	74	1	30	negatywny	1	3	IIIC	-
214	67	2	7	negatywny	1		IV	-
215	56	1	31	pozytywny	1	2	IIC	-
216	57	2	25	negatywny	1	3	IIIC	-
217	59	2	16	pozytywny	1	2	IIIC	-
218	88	1	27	negatywny	1	1	IV	-
219	54	1	27	negatywny	2	3	IIIC	-
220	63	1	27	negatywny	2	2	IIIC	-
221	51	2	19	negatywny	1	2	IIIC	-
222	48	1	16	pozytywny	2	3	IIB	+
223	47	2	10	pozytywny	2	3	IIIC	+
224	51		90		2	3	IC	+
225	49	1	84	pozytywny	1	2		-
226	49	2	49	pozytywny	1	2	IV	+
227	40		48	pozytywny	1			+
228	51	1	24	negatywny	1	2	IIIC	-
229	45	1	23	negatywny	2	3	IA	-
230	44	1	22	negatywny	2	2	IC	-
231	67	2	12	negatywny	1	3	IIIC	-
232	47	1	22	negatywny	1	3	IV	-
233	72	2	16	negatywny	2	2	IIIC	-
234	45	2	17	negatywny	2			-
235	67	1	27	negatywny	2	1	IA	-
237	73	1	22	pozytywny	1	2	IIC	-
238	68	1	20	negatywny	2	2	IIC	-
243	58	1	26	negatywny	1	1	IIIC	-
245	52	1	27	negatywny	2	3	IB	-
249	58	1	28	negatywny	1	1	IIIB	-
251	67	1	20	negatywny	1	1	IV	-
253	58	1	26	negatywny	2	2	IIC	-
254	72	2	14	negatywny	2	3	IV	-
255	78	1	25	pozytywny	1	2	IV	+
256	42	1	24	pozytywny	2	3	IIIA	-
257	63	1	25	negatywny	1	2	IIIC	-
258	66	1	16	negatywny	1	3		-
259	60	2	15	negatywny	2	3	IIIC	-
260	65	2	5	negatywny	2			-
261	43	1	17	negatywny	1	1	IC	-
262	77	1	17	negatywny	2	3	IIIC	-
263					2	2		-
264	60	2	11	negatywny	2	2	IIIC	-
266	71	2	14	negatywny	1	2	IC	+
267	63	1	14	negatywny	1	3	IIIC	-
268	48	2	2	negatywny	2	3	IIIC	-
269	50	2	15	negatywny	1	2	III	-
709	24	2	22	negatywny	1	2	IIIC	-
766	46	2	43	pozytywny	2	3	IC	-
790	65	1	60		1	1	IIB	-

\* przeżycie podane w pełnych miesiącach od daty zabiegu do daty ostatniej konsultacji lub zgonu

\* + obecna mutacja w genie *BRCA1* lub *BRCA2*

- brak mutacji

## 5. METODY

### 5.1. Aparatura

Tabela 5. Wykaz zastosowanej aparatury

Sekwenator automatyczny ABIPRISM310	<b>Applied Biosystem</b>
Termocykler GeneAmp PCR System 2400	
Termocykler GeneAmp PCR System 2700	
System archiwizacji żeli Gel Doc 2000 z oprogramowaniem Quantity One	<b>Bio-Rad</b>
Zasilacz PowerPac 3000	
Wirówka 5810R	<b>Eppendorff</b>
Wirówka 5804	
Wirówka MiniSpin	
Termomikser comfort	
Termocykler Mastercycler personal 96 x 0,2 mL	
Worteks	<b>Ika</b>
Zamrażarka -80°C	<b>Juan</b>
Wirówka próżniowa	<b>Labonco</b>
Cieplarka	<b>Laborgerate Berlin</b>
Termocykler PTC-200 DNA Engine	<b>MJ-Research</b>
Mini Centrifuge MPW15	<b>MPW</b>
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 z oprogramowaniem ND-1000 v 3.1.2	
Spektrofotometr Helios Gamma UV/Vis	<b>SpectroLab</b>
Zestaw DHPLC - System WAVE 3500	<b>Transgenomic Ltd</b>

### 5.2. Odczynniki

Tabela 6. Wykaz odczynników

5.2.1.	Zestaw Exterminator(250)	<b>A&amp;A Biotechnology</b>
5.2.2.	Zestaw Clean-up (250)	
5.5.3.	10x EDTA bufor	<b>Applied Biosystem</b>
5.5.4.	2,5x Sequencing Buffer	
5.5.5.	BigDye Terminator Kit wersja 3.1	
5.5.6.	GeneScan-350 TAMRA	
5.5.7.	Kapilara 47cm x 50µm	
5.5.8.	Polimer POP-4	
5.5.9.	Polimer POP-6	



5.5.10.	30% akrylamid/bis (37,5:1)	<b>Bio-Rad</b>
5.5.11.	Marker wielkości M1	<b>DNA Gdańsk II</b>
5.5.12.	Marker wielkości M100-500	
5.5.13.	Fenol, roztw. nasycony, pH 6.6, z buforem do kalibracji	<b>ICN</b>
5.5.14.	Ksylen	
5.5.15.	Proteinaza K	
5.5.16.	Startery	<b>IDT</b>
5.5.17.	Taq Polimeraza DNA(rekombinowana)	<b>MBI, Fermentas</b>
5.5.18.	10 x bufor $+(NH_4)_2SO_4-MgCl_2$	
5.5.19.	roztwór 25mM $MgCl_2$	
5.5.20.	enzym restrykcyjny Eco471	
5.5.21.	bufor R do enzymu	
5.5.22.	Agaroz PRONA Basic LE	
5.5.23.	Ion Exchanger Amberlite® MB-3	<b>Merck</b>
5.5.24.	Chloroform	
5.5.25.	Izopropanol	
5.5.26.	Alkohol etylowy 96%	<b>POCh Gliwice</b>
5.5.27.	Startery	<b>Startery Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Warszawa</b>
5.5.28.	dNTPs zestaw 40 $\mu$ M	<b>Promega</b>
5.5.29.	Bromek etydyny	<b>Sigma</b>
5.5.30.	Chlorek amonu	
5.5.31.	EDTA	
5.5.32.	TRIS BASE	
5.5.33.	Octan sodu	
5.5.34.	Proteinaza K	
5.5.35.	Kwas borowy	
5.5.36.	Sacharoza	
5.5.37.	Xylene cyanol	
5.5.38.	Bromofenol blue	
5.5.39.	Chlorek sodu	
5.5.40.	Wodorowęglan Potasu	
5.5.41.	Formamid	
5.5.42.	SDS	
5.5.43.	Zestaw WAVE Optimized Buffers	<b>Transgenomic Ltd</b>

### 5.3. Roztwory

#### 5.3.1. Bufor 5xRBC (500 ml)

NH <sub>4</sub> Cl	20,73 g
KHCO <sub>3</sub>	2,3 g
0,5 M EDTA, pH 8.0	10 ml

#### 5.3.2. Bufor do proteiny K

100 mM NaCl
10 mM Tris HCl, pH 8.0
25 mM EDTA, pH 8.0
0.5% SDS

#### 5.3.3. Roztwór roboczy proteiny K 50 mg/ml oraz 20mg/ml

#### 5.3.4. 5xTBE (1000 ml)

Tris	54 g
kw. borowy	27,5 g
0,5 M EDTA, pH 8.0	20 ml

#### 5.3.5. Roztwór roboczy 0,5xTBE (1000ml)

5xTBE	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml

#### 5.3.6. 50x TAE (1000 ml)

Tris	242 g
kw. octowego lodowatego	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8.0	100 ml

#### 5.3.7. Roztwór roboczy 1xTAE (1000ml)

50xTAE	20ml
ddH <sub>2</sub> O	980ml

**5.3.8. 6x bufor obciążający (50 ml)**

0,25% błękit bromofenolowy

0,25% cyjanoksylen

30% glicerol

**5.3.9. Roztwór roboczy bromku etydyny (200ml)**

bromek etydyny (10 mg/ml)                      20µl

1x TEA    199,80 ml

**5.3.10. Roztwór roboczy akrylamidu (100 ml)**

50x TEA    1,9 ml

30% akrylamid/bis (37,5:1)                      23,5 ml

ddH<sub>2</sub>O    74,5 ml**5.4. Izolacja materiału genetycznego****5.4.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej**

Od pacjentek pobrano 10 ml krwi żyłnej do próbek zawierających EDTA. Następnie krew odwirowywano 1811xg przez 10 min. w temperaturze +4° C, przy i odciągano osocze. Do osadu składającego się ze leukocytów oraz pozostałych składników morfotycznych krwi dodawano 10 ml buforu RBC (5.3.1.). Próbki inkubowano przez 10 min. w temp. -20°C, po tym czasie wirowano 1811xg przez 10 min. w temp. +4°C. Z odwirowanych próbek usuwano supernatant. Pozostały osad przepłukiwano 5 ml buforu RBC (5.3.1.) i ponownie wirowano 10 min. w temp. +4°C, 1811xg. Czynności te powtarzano 3-4 krotnie. Następnie do osadu dodano 5 ml buforu do proteiny K (5.3.2.) i silnie wytrząsano. Po dodaniu 12µl proteiny K (5.5.15.) próbki inkubowano przez 16 godz. w temp. 37°C.

Do strawionego materiału dodawano 3 ml fenolu (5.5.13.) i wytrząsano przez 20-30 min. Później wirowano 15 minut, 1811 x g w +4°C,. Górną warstwę przenoszono do nowej próbki. Dodawano 5 ml chloroformu (5.5.24.) i ponownie wytrząsano pod wyciągiem przez 20-30 min., po czym wirowano 6300 x g przez 10 minut, +4°C,(2-3x).

Po ostatnim wirowaniu górną warstwę ostrożnie przenoszono do nowej próbówki i dodawano 5 ml izopropanolu (5.5.25.). Próbówki delikatnie wytrząsano do pojawienia się kłębuszka DNA a następnie umieszczano w -20°C na 30 min.. DNA przenoszono do probówek Eppendorf 1,5ml i 2-3x płukano 70% etanolem, za każdym razem wirując 20817 x g przez 10 min., +4°C,. Po zakończonym wirowaniu usuwano supernatant, a pozostały na dnie osad suszono 20-30 minut w wirówce próżniowej. Gdy alkohol odparował, suchy osad DNA zawieszano w odpowiedniej ilości sterylnej, podwójnie destylowanej wody (150-300µl). Kolejnym etapem było spektrofotometryczne określenie ilości DNA w próbce i rozcieńczenie do stężenia roboczego 30ng/ µl.

#### **5.4.2. Izolacja DNA z mrożonej tkanki nowotworowej**

Z zamrożonego fragmentu guza wycinano skalpelem fragment wielkości 5x5mm, następnie mechanicznie rozdrabniano go i przenoszono do probówki. Do probówki dodawano 500µl buforu do proteiny K (rozdz. 5.3.2.), silnie wstrząsano i dodawano 20 µl 50mg/ml proteiny K (rozdz. 5.3.3.). Następnie próbkę inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C bądź 60 min. w temp. 56°C. Po upływie czasu inkubacji proteinazę inaktywowano przez umieszczenie w temp. 72°C na około 5 min.

Tak przygotowany materiał poddawano ekstrakcji fenolem i chloroformem zgodnie z protokołem stosowanym w izolacji krwi obwodowej (5.4.1.) do momentu rozpuszczenia wysuszonego osadu DNA w odpowiedniej ilości sterylnej, podwójnie destylowanej wody (150-300µl). Podobnie jak w przypadku DNA pochodzącego z krwi, spektrofotometrycznie oznaczono ilość DNA oraz rozcieńczono do stężenia 30ng/ µl.

#### **5.4.3. Izolacja DNA z tkanek nowotworowych zatopionych w parafinie**

Z bloku parafinowego zawierającego zatopioną tkankę nowotworową skrawano 20-30 kawałków o grubości 5µm. Aby usunąć parafinę płukano je dwukrotnie w 700µl ksylenu (rozdz. 5.5.14.) a następnie wirowano przez 15 min., 20°C, 20817 x g. Warstwę ksylenu usuwano a osad przemywano etanolem (5.5.26.) i wirowano (15 minut, 20817 x g). Czynność tę powtarzano

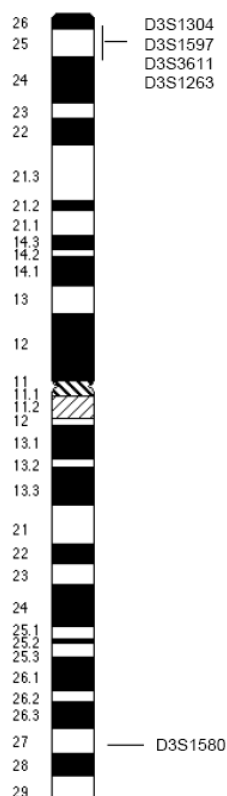
dwukrotnie. Z odwodnionej tkanki usunięto warstwę etanolu i liofilizowano ją przez 25 minut, po czym dodano 300µl buforu do proteiny K oraz 5-10µl roztworu proteiny K 50mg/mL (5.3.3). Całość inkubowano 4-7 dni w temp. 45°C.

Gdy tkanka uległa strawieniu, dodawano 500µl fenolu (rozdz.5.5.13.) wytrząsano przez 10-15 minut a następnie wirowano (15 min., 20°C, 20817 x g). Po wirowaniu, zbierano górną warstwę i przenoszono do nowej próbówki. Dodawano 500µl chloroform (rozdz. 5.5.24.) i ponownie wytrząsano (10-15 min.) oraz wirowano (15 min., 20°C, 20817 x g). Jes zcze raz przeniesiono supernatant do nowej próbówki i dodawano 1ml 96% etanolu (5.5.26.). Próbówki umieszczano na 24h w temp. -20°C. Po upływie wyznaczonego czasu próbki wirowano przez 30 min., 4°C, 20817 x g, usuwano alkohol, a osad suszono przez 30 min. pod wyciągiem. Osad rozpuszczano w wodzie (50-100µl) i po pomiarze spektrofotometrycznym rozcieńczano do stężenia 30 ng/µl.

## **5.5. Technika LOH**

### **5.5.1. Markery mikrosatelitarne z chromosomu 3**

Do analizy utraty heterozygotyczności zastosowano trzy markery z ramion krótkich oraz jeden z ramion długich chromosomu 3. Opierając się na danych literaturowych wybrano markery zlokalizowane w 3p25-26. Dodatkowym kryterium doboru markerów była ich wysoka heterozygotyczność. Wybrano markery dwunukleotydowe, dla których częstość występowania w populacji heterozygot wynosi  $\geq 80\%$ . Wszystkie z badanych markerów znajdowały się w obrębie genów niepowiązanych dotąd z patogenezą raka jajnika. Wybrano również jeden marker z ramion 3q, aby stwierdzić, w których przypadkach utrata objęła cały chromosom. Lokalizację markerów przedstawiono na ryc. 7, natomiast w tab. 7 przedstawiono podstawowe parametry markerów.



**Rycina 7. Lokalizacja markerów mikrosatelitarnych w chromosomie 3**

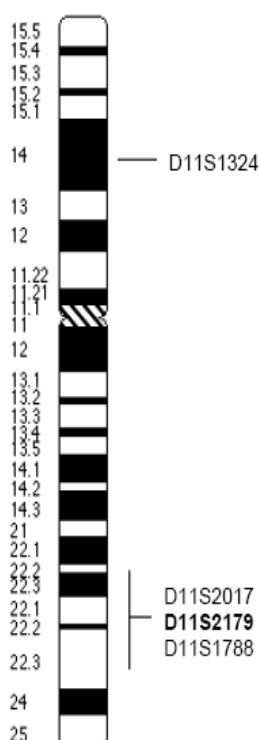
Tabela 7. Charakterystyka markerów zlokalizowanych w chromosomie 3 wykorzystanych do badań LOH

Marker	Starter forward	Starter reverse	Długość produktu (bp)
D3S1304	TTCGCTCTTTGATAGGC	ATTTCAATTTGTAATTTACTAGCAG	253-269
D3S1597	AGTACAAATACACACAAATGTCTC	GCAAATCGTTCATTGCT	162-180
D3S3611	GCTACCTCTGCTGAGCAT	TAGCAAGACTGTTGGGG	107-137
D3S1263	CTAAGTAGGCAGTTGGTATTATTTTC	ATCACAGCAGGGGTTCAATTTTTTC	215
D3S1580	CCACCATACTCCAGTGATCC	TGACCATCTGTCCTGCCTT	139-155

Lokalizację markerów ustalono na podstawie baz danych *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) oraz *Ensembl Genome Browser*. Startery zsyntetyzowano na podstawie sekwencji zawartych w bazie według wersji z dnia 09.09.2003). Aby możliwa była identyfikacja produktu PCR w sekwenatorze automatycznym, każdy ze starterów sensownych (F) został zmodyfikowany na końcu 5' jednym z trzech znaczników fluorescencyjnych (6-FAM, TET, HEX).

### 5.5.2. Markery mikrosatelitarne z chromosomu 11

W literaturze często wymienia się chromosom 11 jako miejsce genomu, w którym zlokalizowane są dotychczas niepoznane geny supresorowe zaangażowane w powstawanie raka jajnika. Szczególnie często wymienianą lokalizacją jest 11q22-24, dlatego też poszukiwania markerów mikrosatelitarnych ograniczono do tego regionu. Wybrano trzy markery zlokalizowane 11q22-23, w tym jeden D11S2179 w obrębie genu *ATM*, znanego genu supresorowego (Ryc. 8). Pozostałe markery nie znajdują się w obrębie *loci* żadnych znanych genów. W wybranej grupie znalazły się zarówno markery dwu- jak czteronukleotydowe. Podobnie jak w przypadku chromosomu 3 wybrano także dodatkowy marker zlokalizowany na przeciwległych ramionach chromosomu. Umieszczenie markerów oraz sekwencje starterów oparto na danych z bazy NCBI (według wersji z dnia 09.09.2003)(Tab. 8). W tym przypadku również każdy ze starterów sensownych został zmodyfikowany na końcu 5' jednym z trzech znaczników fluorescencyjnych (6-FAM, TET, HEX), dzięki czemu po wzbudzeniu znacznika światłem lasera możliwa była identyfikacja produktów PCR podczas elektroforezy kapilarnej.



Rycina 10. Lokalizacja markerów mikrosatelitarnych w chromosomie 11

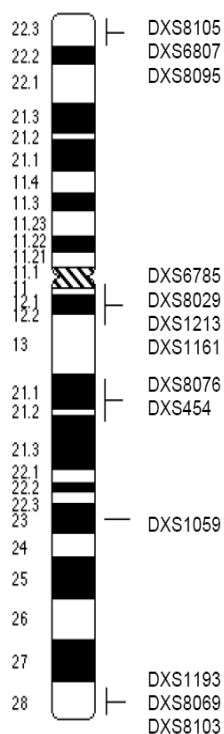
Tabela 8. Charakterystyka markerów zlokalizowanych w chromosomie 11 wykorzystanych do badań LOH

Marker	Starter forward	Starter reverse	Długość produktu (bp)
D11S1324	CCCCTCACCCCTAAAACTTG	GGCACAAGGGGAACCTAACT	110-128
D11S2017	TTTTTAAGCGCACCAAAGAG	TTTGAATAGGAAATTAGATGGTAGG	109-133
D11S2179	TAGGCAATACAGCAAGACCCTG	GCACTGGAATACGATTCTAGCAC	130
D11S1778	TAACCTNCTACACAGTGTCTGTT	GCTTCAGCAGAGAAGCCAT	138-160

### 5.5.3. Markery mikrosatelitarne z chromosomu X

W pierwszym etapie badań do analizy LOH wybrano trzy markery zlokalizowane Xp22.3 oraz jeden DXS8069 umiejscowiony Xq28. Podczas wstępnej analizy otrzymane dane okazały się na tyle interesujące, iż postanowiono rozszerzyć panel markerów o dziewięć kolejnych zlokalizowanych w Xq. Wybrano markery zlokalizowane w Xq12, Xq21, Xq23 oraz Xq28, gdyż jak przedstawiają liczne publikacje to właśnie w tych regionach mogą znajdować się geny modulujące rozwój raka jajnika oraz potencjalne geny supresorowe. W tym przypadku stopień heterozygotyczności nie miał decydującego wpływu na dobór markerów a w badanej grupie znalazły się markery dwu- i czteronukleotydowe, których heterozygotyczność zamykała się w przedziale pomiędzy 0,22 a 0,83 (Tab. 9). W przypadku markera DXS1159 częstość występowania heterozygot w populacji nie została określona. Niektóre z markerów zlokalizowane były wewnątrzgenowo i żaden z genów, w którym umiejscowiony był marker nie został zidentyfikowany jako gen supresorowy. Na ryc.11 przedstawiono lokalizację badanych markerów w oparciu o dane pochodzące z bazy NCBI oraz *Ensembl Genome Browser* (według wersji z dnia 09.09.2003).





**Rycina 11. Lokalizacja markerów mikrosatelitarnych w chromosomie X**

**Tabela 9. Charakterystyka markerów zlokalizowanych w chromosomie X wykorzystanych do badań LOH**

Marker	Starter forward	Starter reverse	Długość produktu (bp)
DXS8105	TTTAGTTTCCTGCCACG	TATCCATGTTTTTCATATTGAG	150-164
DXS6807	GAGCAATGATCTCATTTGCA	AAGTAAACATGTATAGGAAAAAGCT	250-273
DXS8095	GATTGGGAGATGCAGAC	TGTACCCCGAACTTAAAAAC	266-280
DXS6785	CGACACAGCAAGTCTCTGT	GAGGAGGGTCAGAATCTTG	143-163
DXS8029	TGACGGAGCGAGACCTT	AGTGGTAGCCCATCTTGGTG	256-272
DXS1213	CCATAGCCCACCTTTC	TCTGTGCATTTATGTTTATTTG	230-244
DXS1161	GTCCCTGTTTGCAGATGG	TTGCCAGTCCCCTACTT	135-340
DXS1160	CTGAAACCTAAATTGAACGG	CCCCAACTCAGTTTTGA	151
DXS8076	AACCTTAGGATACCCCATATGTG	AGTGCTACCTCCACAAACAG	91-107
DXS454	AGAAGACATAAGGATACTGC	GATCCCAACTATTTCTTTCT	144-145
DXS1059	CCAGGAGATTGAGAGTGGCT	GGACAACCCGTCGTGG	180-200
DXS1193	CTAGCAAGGAAAACCTTGGT	AGTCAGAATTGGGTTGTCTTC	106
DXS8069	AACAGTCATTGTAGGCATCG	GAATTGCCAGTCATCCC	166-174
DXS8103	CGTTGCTTGGGATGGA	AGCCCTGGGGTACACA	200-248

Powyższe bazy stanowiły również źródło, z którego zostały pobrane sekwencje starterów (Tab. 9). Podczas syntezy, każdy starter sensowny został zmodyfikowany znacznikiem fluorescencyjnym (6-FAM, TET lub HEX) umożliwiającym analizę heterozygotyczności w sekwenatorze automatycznym.

#### 5.5.4. Amplifikacja markerów mikrosatelitarnych techniką PCR

Wszystkie markery mikrosatelitarne amplifikowano metodą PCR. Pomimo różnej długości powielanych fragmentów, skład mieszaniny reakcyjnej był taki sam we wszystkich przypadkach. Reakcje PCR przeprowadzano jednocześnie dla trzech markerów różniących się znacznikami fluorescencyjnymi na końcu 5' starterów sensownych, natomiast nieodbiegających od siebie wielkością amplifikowanego produktu. Reakcję PCR przeprowadzano w końcowej objętości 15µl stosując około 45ng genomowego DNA, dokładny skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowany do jednoczesnej amplifikacji trzech markerów LOH

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość (µl)
10x bufor	1,5
Glicerol	1,0
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	1,5
dNTP mix [5 mM]	1,0
Mieszanina starterów [10µM]*	1,0
Polimeraza Taq [5U/µl]	0,12
Woda	5,38
DNA [30 ng/µl]	1,5

\* dodawano trzy mieszaniny starterów po jednej dla każdego amplifikowanego markera

W wyjątkowych przypadkach każdy z markerów był amplifikowany oddzielnie. Skład mieszaniny reakcyjnej w przypadku każdego markera był również taki sam. Reakcję przeprowadzano w objętości 15µl z dodatkiem 45ng genomowego DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tab. 11.

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowany do amplifikacji markerów LOH

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
10x bufor	1,5
Glicerol	1,5
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	0,5
dNTP mix [5 mM]	1,0
Mieszanina starterów [10μM]*	0,08
Polimeraza Taq [5U/μl]	8,92
Woda	1,5
DNA [30 ng/μl]	1,5

Warunki reakcji zostały tak zoptymalizowane, aby były jednakowe dla wszystkich par starterów (Tab. 12).

Tabela 12. Warunki reakcji PCR

Temperatura (°C)	Czas trwania	Liczba cykli
94	5'	1
94	30''	30
54	1'	
72	2'	
72	10'	1
10	∞	

Każdorazowo, podczas reakcji PCR stosowano kontrolę pozytywną, czyli DNA o znanej jakości oraz kontrolę negatywną, gdzie zamiast DNA dodawano analogiczną objętość wody destylowanej.

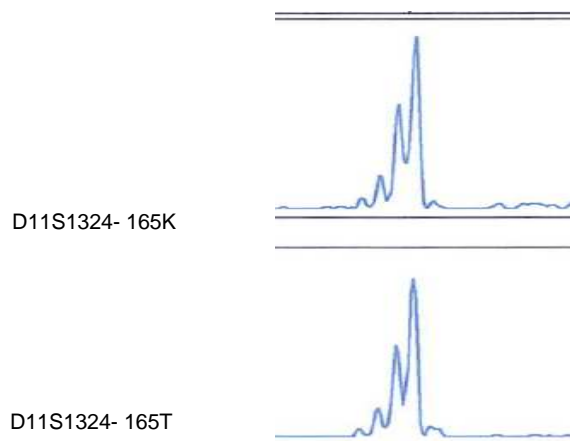
Po zakończonej reakcji sprawdzano obecność produktu PCR przeprowadzając rozdział na 2% żelu agarozowym w 0,5 x TBE.

#### **5.5.5. Analiza zamplifikowanych markerów mikrosatelitarnych**

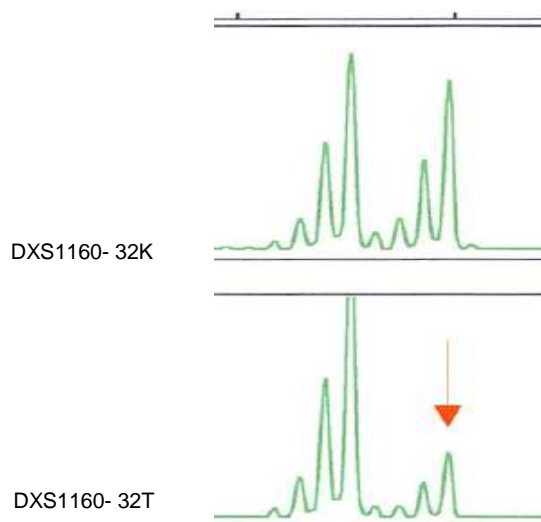
Przygotowując produkty do elektroforezy kapilarnej, do 10µl dejonizowanego formamidu oraz 0,5µl markera wielkości GeneScan-350 lub GeneScan-500, znakowanego TAMRA dodawano 1-2µl mieszaniny produktów PCR znakowanych różnymi znacznikami fluorescencyjnymi (w przypadku markerów amplifikowanych podczas wspólnej reakcji PCR). W przypadku amplifikacji markerów w osobnych reakcjach PCR do mieszaniny dejonizowanego formamidu oraz markera wielkości GeneScan dodawano 1µl produktu znakowanego FAM i TET oraz 2µl produktu znakowanego HEX (1FAM:1TET:2HEX). Tak przygotowane próbki poddawano denaturacji w termomikserze w temp. 95°C przez 2 min. i natychmiast chłodzono na lodzie. Przeprowadzano elektroforezę kapilarną w automatycznym sekwenatorze ABI 310 w temp. 60°C przy natężeniu prądu nie wyższym niż 8µA. Rozdział przeprowadzano standardowo przez 24 min., przy napięciu prądu 15kV. Do odczytu sygnału fluorescencyjnego zastosowano filtr C oraz program komputerowy ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0, do analizy zebranych danych zastosowano program ABI PRISM GeneScan Analysis Program v 3.1.

#### **5.5.6. Ocena utraty heterozygotyczności (LOH)**

Podczas analizy utraty heterozygotyczności porównywano wysokość sygnałów pochodzących z DNA prawidłowego (wyizolowanego z krwi obwodowej - K) z sygnałami z DNA z tkanki nowotworowej pochodzącymi od tej samej chorej (T). Obecność tylko jednego piku fluorescencji w tkance nienowotworowej klasyfikowała przypadek jako nieinformacyjny (homozygotyczny) (Ryc. 12). W przypadkach heterozygotycznych w stosunku do danego markera na elektroforegramie widoczne były dwa piki podstawowe (Ryc. 13).



**Rycina 12. Przykładowy elektroforogram ukazujący przypadek nieinformacyjny markera D11S1324 w próbce nr 165.**



**Rycina 13. Przykładowy elektroforogram ukazujący przypadek informacyjny utraty heterozygotyczności (LOH) markera DXS1160 w próbce nr 32.**

Ocena LOH została oparta na równaniu matematycznym:

$$(N1T2)/(N2T1)$$

gdzie:

N1 i N2-wartościami wysokości sygnałów pochodzących od dwóch alleli w tkance prawidłowej,

T1 i T2 – wysokości sygnałów pochodzących od dwóch alleli w tkance nowotworowej.

W przypadku, gdy otrzymane wartości były większe niż 1, stosowano wzór:  $1/(N1T2)/(N2T1)$ . Założono, iż wyniki poniżej 0,5 świadczą o utracie heterozygotyczności, natomiast wartości wyższe oznaczają jej zachowanie.

### 5.6. Analiza statystyczna otrzymanych wyników

Test  $\chi^2$  Pearsona oraz test  $\chi^2$  dwustronny Fishera wykorzystano do porównania rozkładów otrzymanych wyników. Przypadki nieinformacyjne zostały odrzucone, oceniano tylko obecność utraty heterozygotyczności *versus* nieobecność LOH. Do celów statystycznych dokonano podziału chorych na kilka grup pod względem różnych parametrów.

#### Zgon

żyje -1 (n=66)

zgon-1 (n=99)

#### FIGO

FIGO I-II- 1 (n=33)

FIGO III-IV-2 (n=132)

#### grade

G1- 1 (n=28)

G2/3- 2 (n=137)

#### Mutacje *BRCA1/2*

brak mutacji- 1 (n=139)

obecna mutacja -2 (n=26)

#### Obecność LOH

0-2 utraty- 1 (n=82)

3-13 utrat- 2 (n=83)

Test W Shapiro-Wilka zastosowano, aby zbadać czy badane zmienne prezentowały rozkłady normalne. Nieparametryczny test U Manna-Whitney'a zastosowano do porównania median zmiennych ciągłych. Ocena przeżycia pacjentek z utratami markerów i bez utrat została przeprowadzona testem log-rank w oparciu o krzywe przeżycia Kaplana-Meyera. Aby wyłonić z grupy zmiennych niezależnych czynniki wpływające na przeżycie, zastosowano nieparametryczny model proporcjonalnego hazardu Coxa. We wszystkich przeprowadzonych analizach za statystycznie znamienne przyjęto wartość  $p \leq 0,05$ .

Odmianę sieci neuronalnych zwaną algorytmem genetycznym zastosowano, aby ze zmiennych niezależnych wyłonić podzbiory zmiennych wzajemnie uzależnionych (wymagających wspólnej obecności). Obliczeń dokonano z zastosowaniem oprogramowania *STATISTICA for Windows 7.1* firmy StatSoft (Stanisz 1998, Stanisz 2002).

## 6. Wyniki

### 6.1. Analiza utraty heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w chromosomach 3, 11, X.

Badanie utraty heterozygotyczności (LOH) przeprowadzono w 165 guzach. Do analizy zastosowano cztery markery mikrosatelitarne z ramion krótkich chromosomu 3, trzy markery z ramion długich chromosomu 11 oraz czternaście markerów z obu ramion chromosomu X. Wykonano również analizę LOH dwóch dodatkowych markerów z pochodzących z 3q i 11p, aby stwierdzić czy utraty heterozygotyczności występowały tylko na jednym z ramion chromosomów. W tabeli 13 przedstawiono wyniki analizy LOH dla wszystkich analizowanych markerów

Tabela 13. Wyniki analizy LOH markerów zlokalizowanych w chromosomach 3 i 11 i X.





nr krwi	chromosom 3					chromosom 11				chromosom X														
	D3S1304	D3S1597	D3S3611	D3S1263	D3S1580	D11S1324	D11S2017	D11S2179	D11S1778	DXS8105	DXS6807	DXS8095	DXS6785	DXS8029	DXS1213	DXS1161	DXS1160	DXS8076	DXS454	DXS1059	DXS1193	DXS8069	DXS8103	
92															0		NI	1	NI	1				
93	0	0			0	1	0	0	0	0	0	0			0	1		NI			1	1	0	
94	0	0			0	0	0	NI	NI	0	0	0			NI			1	0	0	1	1		
95	NI	NI			NI	0	NI	NI		NI	0	1	0	0	0				0	0	0	0	NI	
96	1	0			0	0	0	1	0	0	0	0	1			0	0	0	0	1	NI	0	0	
97	0	0	0		0	0	0	1	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	1	NI	
99	0	1			1	0	1	NI	0	NI	0	NI						0	NI					
100	0	0			0	0	0	0	NI	1	1	NI	0	0	0			NI	0	0	0	1		
102	NI	0			0	0	0			0														
104	0	0			0	0	0	NI	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	NI	1	NI	
108	0	0			0	0	1		1			0			NI	NI		NI	0	0	NI	0	NI	
110	0	1			0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	NI		0	0	0	0	1	NI	
111		NI	NI		NI	0		NI		0	NI	0	1		0	NI	0	1	0	0		0	0	
112	0	NI			0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0			0	0	0	0	0		
113									NI	0	NI	0												
115	0	0				1	NI	NI		0	0	0	0		0	1	NI	1	NI	1			1	
118					NI	0	1					0			0			NI	0	0	0	NI	NI	
120	0	0	1	0		0	1	0	0	0	1	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
121	0	0		0	0	0	0	0	0	NI	0	0	1		NI	NI		0	0	0	NI	0		
122	0	0	0			0	0			NI	0	0	0			NI		0	0	0	NI	0	NI	
124		0	1			0	0			NI	0	0			0			1	0	0		0		
125	0	0	NI		0	0	0			NI	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
126	0	0	0	0	0	0	0			NI	1	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	NI	
127	0	0	1	1	1	0	NI			0	1	1				0	0	0	NI	0	1	1	0	
128	0	0	NI	0		0	NI			0	NI	0	0	0			NI	0	0	0	0	0	NI	
129	0	0	0	0	0	0	1			0	NI	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
131	NI	0	0	0	0	1	1			0	0	0	0			0	NI	NI	0	0	0	0		
132	0	0	0	0	0	0	0			NI			1	1	0			NI	0	0		0		
133	0	0	0	0	0	0	NI			0	0	0			0	1	1	NI	0	0	0	0		
134												1	0	1	0	1	0	0	1	1			1	

nr krwi	chromosom 3					chromosom 11				chromosom X													
	D3S1304	D3S1597	D3S3611	D3S1263	D3S1580	D11S1324	D11S2017	D11S2179	D11S1778	DXS8105	DXS6807	DXS8095	DXS6785	DXS8029	DXS1213	DXS1161	DXS1160	DXS8076	DXS454	DXS1059	DXS1193	DXS8069	DXS8103
135	0	0	0	0		0	NI			0	NI	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
136	1	1	1	1	1	1	NI	0	1	1	NI	1	1	0	1			NI	1	0	1	1	
137	NI	0	NI			0	NI	0		NI	NI		NI	NI	NI		NI	NI	NI		NI		
138	0	0	0		0	0	NI	1	NI	0	0	0			NI		NI					0	NI
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	NI	0	0	0	0
141	1	1	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144	0	0	NI			0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NI	0	0	0	0
145	1	0	0	0	0	0	NI	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	NI	0	1	0	1
152	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	NI	0	1	0	NI	0	0	0	NI	0	1	0	1
153	1	1	0	0		1	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	NI
155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	NI	0	0	0	0	0	0
157	1	1	0		0	0	1	0	0	0	NI	0	1	0		0	0	0	0		0	1	NI
158	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0		0		NI	NI	0		1	0	
159	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
160	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	NI				1		NI	0	0	
161	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1			0	0	
165	0	0	1	NI	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	0	0
166	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	NI	0	1	NI
167	0	0	0	0	0	0	1			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
169	0	NI	1	0	0	0	0	0	0	0	NI	0				0	1	0	0		0	0	0
170	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
171	1	1	0	0		1	NI	0	NI	1	1	0	0	0	NI		1	0	0	NI	0	1	
172	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0		0	1	NI		0	0	0	1	0	NI	1	1	0	NI		0	0	0
175	0	0	0	0	1	0	NI	0	0	0	0	0		0	NI	0	0	0	NI	NI	0	0	0
176	0	0	0	1	0	0	NI	0	0	0	0	0	NI	0	0		NI	0	0	NI	0	0	
177	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
179	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1			0	0	1
180	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			1	0	NI	NI		0	0	0

nr krwi	chromosom 3					chromosom 11				chromosom X													
	D3S1304	D3S1597	D3S3611	D3S1263	D3S1580	D11S1324	D11S2017	D11S2179	D11S1778	DXS8105	DXS6807	DXS8095	DXS6785	DXS8029	DXS1213	DXS1161	DXS1160	DXS8076	DXS454	DXS1059	DXS1193	DXS8069	DXS8103
181	NI	0	1	NI	0	0	0	0		NI	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0			1
182	0	1	0	0	1	0	1	NI	1	0	0	0	0			1	0	0	NI			NI	
183	1	1				0	1	0	0	0	0	NI	NI	NI			NI				NI	NI	
184	1	NI	NI	1	1	0	0	0	0	0	0	0			0	NI	0	0	1		1	NI	0
185	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	NI	0	0	0		0	0	0	0	0	1	0	0
186	0	0	NI	0	0	0	1		NI	0	0	0		NI		NI	0	0	0	0	0	NI	NI
187	1	0	1	1		1	0	NI	NI	1	NI	0	NI	NI		0	0	NI			0		0
189	1	1	0	NI	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	
190	1	1	0	1	0	0	0	NI	NI	0	0	0	0	0		0	0	0	0		NI	NI	
191	0	0	0	0	0	0	1	NI	0	0	NI	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0
192	0	NI	0	0	NI		1	NI	1	0	0	0	0	NI		0		0			1	NI	
194	0	0	0	NI	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	0	0
195	0	0	0	0	0		1	NI	1	NI	NI	0	0	1		0	1	1	1		0	NI	NI
196	NI	0	0	0	1	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	1	NI	1	0	0	0	1		NI
197	0	0	1	0	0	NI	NI	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	NI	0
198	0	0	0	0	0		NI	1	NI	1	NI		0			0	1	0	0				
199	0	0	0	0	NI	NI	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	NI	0
200	1	1	1	1	0	1		1	0	1	NI	0	NI	0	0	NI	0	0	NI	0	0	NI	
201	0	1	1	1	0	0	0	NI	NI	0	NI	1	NI	0	0	0	NI	1	0	0	0	NI	
203	0	0	0	0	0	0	1	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	1	0	0
204	0	0	NI	0	0	0	0	NI	NI	0	0	0	NI	0		0	0	0	0	0	0		0
205							NI	NI	NI	NI	NI										0	NI	
206	NI	0	0	1	1	0	NI	0	1		NI	0	NI	0		0	0	0	0		0	0	0
208	1	1	0	NI	1	NI	NI	NI	0	1	0	0	1	0	0	0	NI	0	0	0	0	1	1
209	NI	NI	0	0	0	NI	0	NI	0	NI	0	0	0	0		0	0	0	0	0	NI		0
211	0	1	0	0	NI	0	NI	0	NI	0	0	0	0	0		0	0	0	NI	0	NI	NI	0
212	0	0	NI	NI	NI	0	0	NI	0	0	NI	1	NI	0		NI	NI	0	0	0	0	0	0
213	NI	1	NI	0	NI	0	NI	0	0	NI	1	0					0	0	0	1	NI		
214			NI	0	0	0	0	0	0		NI		0	0			0	0	NI	0	0		
215		0	0	0	1	0	NI	0	0	NI	1		0	NI			0	1	1	0	0		

nr krwi	chromosom 3					chromosom 11				chromosom X													
	D3S1304	D3S1597	D3S3611	D3S1263	D3S1580	D11S1324	D11S2017	D11S2179	D11S1778	DXS8105	DXS6807	DXS8095	DXS6785	DXS8029	DXS1213	DXS1161	DXS1160	DXS8076	DXS454	DXS1059	DXS1193	DXS8069	DXS8103
216	NI	1	0	0		0	0	0	1	0			NI	0	0	0	0	0	0	NI	NI	NI	0
217	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	NI	NI					NI	0	0	0	NI	NI	NI
218	1	1	0	0	0	0	0	0	1	NI		NI	0	0	0	0	1	0	0	0	NI		
219	0	0	0	0		1	NI	0	0	0	0	1	NI	NI			0	NI	0	1	NI		
220	0	NI	0	0		1	1	1	NI	NI	1	1	0	0		0	0	0	1	1	0		0
221	0		0	0		1	0	0	0	NI	NI		0	1			NI	0		1	NI	NI	
222		0	1	1		0	0	NI	0	NI	1	0	1	0	1		NI				0	1	
223		0				0		1	0	0	NI		0			NI	NI	0	NI		NI	NI	
224			0					NI	0				0			0		?			NI	NI	
225	0	0	0	NI	1	NI	0				NI	1	1	0	0	0	0				NI	0	
226	0	0	NI			1	0	NI	NI			NI		0			0	0			NI	0	
227	0	NI	1		0	NI	1	1	0	0	NI	NI	NI	NI				1	1			NI	
228	0		NI				NI	NI	NI	0	0	0	0	1	1	0	NI	1	0		1		0
229	0	0	0	0		0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		0		0	0	NI	
230	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0		0	NI	0
231	0	0	0	0		1	NI	1	1	0	NI	0		1		1	1	1			0	0	
232	0	0	0	0		0	NI	NI	0	0	NI	0	0		NI	0		1				NI	
233	0	1	NI	0	NI	1	NI	0	1	0	NI	0				NI	1	1	NI	NI	1	NI	
234	1	NI	0	1		1	NI	NI	0	0	0		0	0	0	0	0	0			0	0	0
235	0	1	0		NI	0	0	1	0	NI	NI		0				0	0			NI	NI	
237	1	1	NI	1		1	NI		0	NI	0		1	0	0	1	0	0	1	0	NI	NI	1
238	0	0	NI	0		1	NI	0	0	0	0		NI	NI		0	0	1			0	NI	1
243	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	0	1	0	0	0	0	
245	NI	1	NI	1		0	1	0	0	0			1	NI	NI			1	0	1	0	0	
249	NI	0	NI	0	0	0	0	0	NI	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251	NI	NI	NI	0	NI	0	NI	0	NI	0	0	0	1		NI	NI		0	0		0	0	
253		1	1	0				NI		1	0		NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
254	NI	NI	1			NI	0	NI	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NI	
255	NI	NI	0	0	0	NI	0	0	0	1	1		0	0	1	0	0	1	0			NI	
256	0	0	1	0		NI			0	NI	0		0	0	0	0	0	1	1	0	NI	NI	

nr krwi	chromosom 3					chromosom 11				chromosom X													
	D3S1304	D3S1597	D3S3611	D3S1263	D3S1580	D11S1324	D11S2017	D11S2179	D11S1778	DXS8105	DXS6807	DXS8095	DXS6785	DXS8029	DXS1213	DXS1161	DXS1160	DXS8076	DXS454	DXS1059	DXS1193	DXS8069	DXS8103
257	NI	0	NI		NI					0	1						0	NI				0	
258			0	0	0	1	0	0	0	0												0	
259		NI		0				NI		NI			0	0	0	0	1	0		0	1		0
260	NI	NI	1		NI	0	1	NI	1	1			1	0	1	1	1	0		0	1	NI	0
261	NI	NI						NI	NI												0	NI	
262	NI	0	1	0	NI	1	1	0	0	0												NI	
263						1		0	0				1	0	1	0	0	0	0		0	NI	
264	NI	1	1			0	1			1				NI	NI	NI	NI	NI				1	NI
266	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NI		1	NI				1	0		1	0	
267	1	NI	1	0	NI	0	0	0	0	0	1		NI	NI		NI	NI				0	1	NI
268	0	NI	0	0	NI	0	NI	0	NI	0	NI		NI		NI	NI	NI	1				NI	NI
269	NI	NI	0	1		0	0	1	0	1	NI		0	NI	NI	NI	0	NI			1	NI	NI
708										0	1		1	0	0	1	0	1	1		0		NI
709	NI	0				1	1	0	0	NI	0		0	0	NI	1	1	1	0		1	NI	1
766	NI	NI				1	1	0	1	0	NI		0	0	0	0	1	0	0	0	0	NI	1
790	NI	0				1	NI	NI	NI				0	0	0	0	NI	0			0	NI	

- NI przypadek nieinformacyjny
- 0 brak utraty heterozygotyczności
- 1 utrata heterozygotyczności
- brak danych

Badanie utraty heterozygotyczności (LOH) przeprowadzono dla 23 markerów mikrosatelitarnych. Dla wszystkich analizowanych markerów wykonano 3795 oznaczeń, uzyskano 2412 ( $n=2412/3795$ ; 63,5%) wyników informacyjnych oraz 576 ( $n=576/3795$ ; 15,2%) wyników nieinformacyjnych. Wyników nie uzyskano w 809 przypadkach ( $n=809/3795$ ; 21,3%). Największy odsetek wyników informacyjnych uzyskano dla markerów z chromosomu 11 ( $n=454/660$ ; 69%). Średnia liczba utrat heterozygotyczności z wszystkich analizowanych markerów przypadająca na *loci* wynosi 3,35.

U 15 pacjentek nie zaobserwowano utraty żadnego z badanych markerów, natomiast utratę przynajmniej jednego markera odnotowano w 149 przypadkach. U jednej pacjentki wszystkie otrzymane wyniki były nieinformacyjne (#90). Najczęściej, w 32 przypadkach, tracone były dwa *loci* u jednej badanej, a największa liczba utrat obserwowana u pacjentki wynosiła 13 (#136) (Tab. 14).

Tabela 14. Zestawienie wyników liczby LOH przypadających na pacjentkę

Liczba utraconych markerów	Liczba pacjentek	(%)
0	20	12
1	30	18
2	31	18,8
3	32	19,4
4	17	10,3
5	10	6
6	10	6
7	9	5,4
8	2	1,2
9	1	0,6
11	1	0,6
13	1	0,6

\*( $n=165$ )

Analizą LOH markerów z chromosomu 3 objęto 825 próbek. Dla pięciu analizowanych markerów otrzymano 525 wyników informacyjnych ( $n=525/825$ ; 63%) oraz 110 nieinformacyjnych ( $n=110/825$ ; 13%). W próbkach, w których uzyskano wyniki informacyjne, utratę heterozygotyczności zaobserwowano w 105 przypadkach ( $n=105/525$ ; 20%) a w 420 nie zaobserwowano zjawiska LOH (80%). Utratę przynajmniej jednego z analizowanych markerów z chromosomu 3 zanotowano w 65 przypadkach ( $n=65/165$ ; 39%). Najczęściej w jednym guzie utracie ulegał jeden marker- 36 przypadków ( $n=36/165$ ; 22%).

Tabela 15. Częstość zjawiska LOH dla poszczególnych markerów z chromosomu 3

Lokalizacja	Marker	Liczba przypadków informacyjnych	Częstość LOH (%)	Gen
3p25	<b>D3S1304</b>	brak LOH 92	19	<i>GRM7/SCA15</i>
		LOH 22		
		$\Sigma$ 114		
3p25	<b>D3S1597</b>	brak LOH 95	23	<i>CAV3</i>
		LOH 29		
		$\Sigma$ 124		
3p25	<b>D3S3611</b>	brak LOH 78	25	<i>ATP2B2</i>
		LOH 26		
		$\Sigma$ 104		
3p25	<b>D3S1263</b>	brak LOH 74	18	<i>ATG7</i>
		LOH 16		
		$\Sigma$ 90		
3q27	<b>D3S1580</b>	brak LOH 81	15	<i>LPP LIM</i>
		LOH 14		
		$\Sigma$ 95		

W chromosomie 3 do utraty heterozygotyczności najczęściej dochodziło w markerach D3S3611 ( $n=26/104$ ; 25%) i D3S1304 ( $n=22/92$ ; 22%). Tylko w jednym guzie doszło do utraty wszystkich pięciu markerów (#136) - był to rak nabłonkowy o średnim zróżnicowaniu w stadium FIGO IIIC usunięty od pacjentki z negatywnym wywiadem rodzinnym. Odnotowano również pojedynczy przypadek (#200), w którym utracone zostały cztery markery. *Loci*, w których doszło do utraty heterozygotyczności zlokalizowane były na ramionach krótkich chromosomu 3. Zaobserwowane utraty z ramion krótkich miała miejsce w raku nabłonkowym w stadium FIGO IV pochodzącym od pacjentki z negatywnym wywiadem rodzinnym.



Badanie utraty heterozygotyczności w chromosomie 11 przeprowadzono w grupie 660 próbek. Wyniki informacyjne uzyskano w 454 przypadkach (n=454/660; 69%), a w 16% (n=107/660) próbek otrzymano wyniki nieinformacyjne. Zjawisko LOH wystąpiło w 19% badanych próbek (n=84/454). Najwięcej utrat dotyczyło markera D11S1778 (n=23/105;22%), zaś w kolejnych markerach odnotowano taki sam 20% odsetek LOH (D11S2017-n=22/112; i D11S1324-n=27/138). W 37% analizowanych guzów doszło do utraty przynajmniej jednego markera (n=61/165; 37%)

Tabela 16. Częstość zjawiska LOH dla poszczególnych markerów z chromosomu 11

Lokalizacja	Marker	Liczba przypadków informacyjnych	Częstość LOH (%)	Gen
11p14	D11S1324	brak LOH 111	20	
		LOH 27		
		Σ 138		
11q22-23	D11S2017	brak LOH 90	20	
		LOH 22		
		Σ 112		
11q22-23	D11S2179	brak LOH 87	12	ATM
		LOH 12		
		Σ 99		
11q22-23	D11S1778	brak LOH 82	22	
		LOH 23		
		Σ 105		

W żadnym przypadku nie doszło do utraty wszystkich czterech badanych markerów. Natomiast w trzech guzach (#220, 231, 709) utracie uległy 3 markery, wszystkie pochodziły od chorych z negatywnym wywiadem rodzinnym. Za wyjątkiem guza nr 220, nr 231 i 709 były to raki surowicze, w stadium FIGO IIIC.

Analizę utraty heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w chromosomie X przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie do analizy LOH zastosowano cztery markery mikrosatelitarne z chromosomu X. Były to trzy markery z ramion krótkich: DXS8095, DXS6807, DXS8105 oraz jeden z ramion długich- DXS8069. Ponieważ wyniki wstępnej analizy były obiecujące, do badanej puli dołączono 10 nowych markerów zlokalizowanych w

Xq. Ogółem w grupie 165 chorych ocenie poddano 14 markerów. Wykonano 2310 oznaczeń, z czego otrzymano 1419 wyników informacyjnych (61%) oraz 359 nieinformacyjnych (15%). Do utraty heterozygotyczności doszło w 276 przypadkach informacyjnych ( $n=276/1419$ ; 19%). Pod względem liczby LOH dominowały dwa markery zlokalizowane w Xq: DXS1193 i DXS6785, gdzie odsetek utrat sięgał 27% ( $n=29/109$ ;  $n=31/115$ ). Wśród analizowanych markerów z ramion krótkich chromosomu X utraty najliczniej występowały w *locus* DXS6807 ( $n=22/98$ ; 22%). Aż w 71% ( $n=118/165$ ) badanych guzów doszło do utraty przynajmniej jednego markera.

Tabela 17. Częstość zjawiska LOH dla poszczególnych markerów z chromosomu X

Lokalizacja	Marker	Liczba przypadków informacyjnych	Częstość LOH (%)	Gen
Xp22	<b>DXS8105</b>	brak LOH 103	16	-
		LOH 20		
		Σ 123		
Xp22	<b>DXS6807</b>	brak LOH 76	22	<i>RA31</i>
		LOH 22		
		Σ 98		
Xp22	<b>DXS8095</b>	brak LOH 97	12	-
		LOH 13		
		Σ 110		
Xq12	<b>DXS6785</b>	brak LOH 78	31	-
		LOH 35		
		Σ 113		
Xq12	<b>DXS8029</b>	brak LOH 80	15	<i>MSN</i>
		LOH 14		
		Σ 94		
Xq12	<b>DXS1213</b>	brak LOH 53	30	-
		LOH 23		
		Σ 76		
Xq12	<b>DXS1161</b>	brak LOH 85	17	-
		LOH 17		
		Σ 102		
Xq12	<b>DXS1160</b>	brak LOH 75	21	<i>OPHN1</i>
		LOH 20		
		Σ 95		
Xq21	<b>DXS8076</b>	brak LOH 98	25	-
		LOH 32		
		Σ 130		
Xq21	<b>DXS454</b>	brak LOH 88	15	-
		LOH 15		
		Σ 103		
Xq23	<b>DXS1059</b>	brak LOH 82	16	<i>TRPC5</i>
		LOH 15		
		Σ 97		
Xq28	<b>DXS1193</b>	brak LOH 80	27	-
		LOH 29		
		Σ 109		
Xq28	<b>DXS8069</b>	brak LOH 78	19	<i>CXorf6</i>
		LOH 18		
		Σ 96		
Xq28	<b>DXS8103</b>	brak LOH 54	18	<i>MRXSL, BPP</i>
		LOH 12		
		Σ 66		

Największa odnotowana liczba utraconych markerów wynosiła 6 i wystąpiła w siedmiu guzach. W przypadku #136 zanotowano największą liczbę

traconych *loci* wśród wszystkich badanych, oprócz sześciu markerów z chromosomu X, utracie uległy również wszystkie analizowane markery z chromosomu 3 oraz dwa z chromosomu 11. Przypadek ten został opisany już wcześniej przy analizie LOH chromosomu 3. Pozostałe guzy, w których utracie uległo sześć markerów z chromosomu X, były rakami nabłonkowymi w stadium FIGO IIIB i IIIC. Pochodziły one od chorych z negatywnym wywiadem rodzinnym w tym od jednej nosicielki mutacji w genie *BRCA1*.

## 6.2. Analiza statystyczna otrzymanych wyników badań molekularnych.

Aby ocenić znamienność statystyczną pomiędzy częstością występowania zjawiska LOH a niektórymi parametrami klinicznymi zastosowano test  $\chi^2$  Pearsona oraz test  $\chi^2$  dwustronny Fishera.

Pierwszym z analizowanych parametrów był wiek badanych w momencie zachorowania. Zależność pomiędzy wiekiem pacjentek a częstością zjawiska LOH zaobserwowano tylko w przypadku markera D3S1597 ( $p=0,048$ ). Utrata heterozygotyczności tego markera występowała z mniejszą częstością u chorych z grupy 1. Spośród markerów z chromosomu 3 tylko jeszcze w przypadku markera D3S1263 stwierdzono znamienny statystycznie związek pomiędzy liczbą utrat a jednym z analizowanych parametrów klinicznych. Liczba utrat w *loci* tego markera różniła się w zależności od stopnia zaawansowania histologicznego (G) guza ( $p=0,039$ ). D3S1263 był częściej tracony w guzach o znacznych cechach atypii (G3) niż w guzach nisko i średnio zróżnicowanych (G1,G2). W przypadku pozostałych markerów zlokalizowanych w chromosomie 3 nie wykazano statystycznie znamiennej zależności pomiędzy częstością utrat a pozostałymi parametrami klinicznymi.

W przypadku analizy statystycznej utrat markerów z chromosomu 11 wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy liczbą LOH markera D11S1324 i stopniem zaawansowania histologicznego (G) guza ( $p=0,038$ ). Tak samo jak w przypadku markera D3S1263 w guzach w stadium G3 odnotowywano większą częstość LOH. Zależność taka występowała również w przypadku analizy guzów, w których występowała utrata przynajmniej jednego markera w porównaniu do tkanek nowotworowych, w których LOH nie wystąpiło w ogóle ( $p=0,048$ ).

Podczas analizy statystycznej markerów zlokalizowanych na chromosomie X związki pomiędzy LOH a stopniem zaawansowania histologicznego występowały najliczniej. Związek taki odnotowano w dwóch markerach z Xp: DXS8095 ( $p=0,047$ ) i DXS8105 ( $p=0,041$ ) oraz jednym z Xq: DXS1059 ( $p=0,033$ ), gdzie wysoki odsetek utrat przeważał w guzach w zaawansowanym stadium G3. Zależność ta została zachowana również w momencie podzielenia grupy według liczby traconych *loci* w chromosomie X (grupa 1  $\leq 1$  LOH, grupa 2  $\geq 2$  LOH), gdzie guzy w stadium zaawansowanym (G3) prezentowały większą liczbę utrat heterozygotyczności. Tylko w jednym *loci* markera DXS1161 zaobserwowano korelację pomiędzy liczbą utrat a zaawansowanym stopniem klinicznym nowotworu (FIGO III-IV). Natomiast raki w stadium FIGO III i IV odznaczały się mniejszą liczbą utrat niż nowotwory w stadium FIGO I i II ( $p=0,018$ ). Stwierdzono zależność pomiędzy występowaniem utrat heterozygotyczności markerów DXS8095 ( $p=0,014$ ), DXS8015 ( $p=0,013$ ), DXS6785 ( $p=0,024$ ) a obecnością germylnych mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

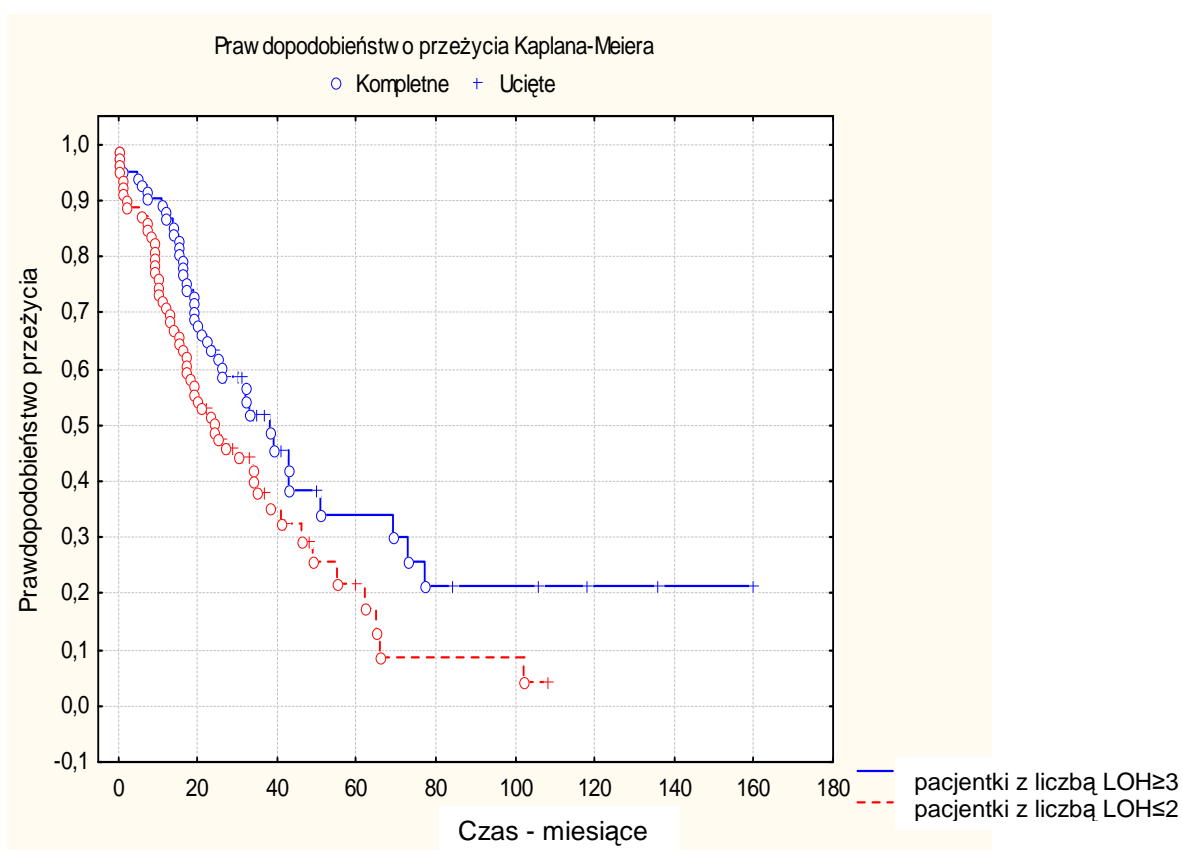
Raki jajnika pochodzące od nosicielek mutacji *BRCA1/2* charakteryzowały się częstszymi utratami heterozygotyczności oraz odmiennym wzorem utrat w porównaniu do nowotworów sporadycznych (Tab. 18).

Tabela 18. Częstość zjawiska LOH u pacjentek z germinalną mutacją *BRCA1/2* i bez mutacji. Pogrubionym drukiem zaznaczono te markery, w których częste LOH korelowało z obecnością mutacji w genach *BRCA1/2*.

Chromosom	Marker mikrosatelitarny	Liczba LOH/liczba przypadków informacyjnych (%)			
		Obecna mutacja <i>BRCA1/2</i>	Brak mutacji	Ogółem	Test Fishera (p=0,05)/ Yatesa
3	D3S1304	5/21 (24)	17/93 (18)	22/114 (19)	0,55/0,78
	D3S1597	6/22 (27)	23/102(22)	29/124 (23)	0,41/0,85
	D3S3611	5/13 (38)	21/91 (23)	26/104 (25)	0,19/0,39
	D3S1263	2/9 (22)	14/81 (17)	16/90 (18)	0,50/0,93
	D3S1580	0/16 (0)	14/79 (18)	14/95 (15)	0,06/0,15
11	D11S1324	4/21 (19)	23/117(20)	27/138 (20)	0,61/0,81
	D11S2017	3/22 (14)	19/90 (21)	22/112 (20)	0,32/0,62
	D11S2179	2/16 (12)	10/83 (12)	12/99(12)	0,61/0,71
	D11S1778	2/20 (10)	21/85 (25)	23/105(22)	0,13/0,26
X	<b>DXS8105</b>	7/20 (35)	13/103 (13)	20/123 (16)	<b>0,021/0,03</b>
	DXS6807	4/15 (27)	18/83 (22)	22/98 (22)	0,48/0,93
	<b>DXS8095</b>	5/17 (29)	8/93 (9)	13/110 (12)	<b>0,028/0,04</b>
	<b>DXS6785</b>	8/18 (44)	27/95 (28)	35/113(31)	<b>0,026/0,04</b>
	DXS8029	2/15 (13)	12/79 (15)	14/94 (15)	0,61/0,83
	DXS1213	4/10 (40)	19/66 (29)	23/76 (30)	0,35/0,73
	DXS1161	2/15 (13)	15/87 (17)	17/102 (17)	0,52/1,0
	DXS1160	2/11 (18)	18/66 (27)	20/95 (21)	0,58/0,88
	DXS8076	7/20 (35)	25/110 (23)	32/130 (25)	0,18/0,37
	DXS454	2/17 (12)	13/86 (15)	15/103 (15)	0,52/0,98
	DXS1059	4/14 (29)	11/83 (13)	15/97 (15)	0,14/0,28
	DXS1193	5/16 (31)	24/93 (26)	29/109 (27)	0,43/0,88
	DXS8069	4/17 (23)	14/79 (18)	18/96 (19)	0,40/0,83
	DXS8103	2/8 (25)	10/58 (17)	12/66 (18)	0,44/0,96

Dodatkowo, wszystkie przypadki podzielono na dwie grupy w zależności od liczby utrat we wszystkich badanych markerach. W grupie 1 znalazły się guzy z o niskiej liczbie LOH ( $\leq 2$ ), natomiast w grupie 2 nowotwory, w których liczba utrat przewyższała 3 *loci* ( $\geq 3$ ). Korelacje istotne statystycznie zaobserwowano jedynie między guzami z licznymi utratami i zaawansowanym stopniem histologicznym guza (G3,  $p=0,00073$ ).

Porównując wiek pacjentek z innymi zmiennymi, testem U Manna-Whitney'a uzyskano tendencję do znamienności statystycznej pomiędzy obecnością mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* a młodszym wiekiem pacjentek ( $p=0,053$ ). Zbadano również wpływ utraty heterozygotyczności poszczególnych markerów na czas przeżycia chorych z zastosowaniem testu log-rank oraz metody limitu iloczynowego Kaplana i Meiera. Te same testy zastosowano również szacując czas przeżycia w zależności od liczby utraconych *loci* na chromosomie 3, 11, X oraz dla ogólnej liczby odnotowywanych utrat na wszystkich chromosomach (metody 5.6.). Różnice w czasie przeżycia zaobserwowano jedynie między pacjentami, u których utraty heterozygotyczności występowały nielicznie ( $\leq 2$ ) a chorymi z wieloma LOH ( $\geq 3$ )(ryc14). Chore, u których LOH w guzach występowało często charakteryzowały się dłuższym czasem przeżycia w porównaniu do pacjentek, u których utraty heterozygotyczności były mniej liczne.



**Rycina 14. Prawdopodobieństwo przeżycia dla pacjentek w zależności od liczby traconych *loci*.**

Aby ocenić w grupie zmiennych niezależnych, które z nich wpływają na przeżycie zastosowano nieparametryczny model proporcjonalnego hazardu Coxa. Potwierdzono wpływ FIGO ( $p=0,000013$ ) na czas przeżycia. Również sześć z 23 analizowanych markerów mikrosatelitarnych (D3S1263  $p=0,037$ , D11S2017  $p=0,028$ , DXS8095  $p=0,0092$ , DXS8029  $p=0,0146$ , DXS8076  $p=0,032$ , DXS1059  $p=0,0026$ ) uznano jako niezależne czynniki rokownicze. Utraty heterozygotyczności w markerach D3S1263, DXS8095, DXS8029, DXS8076, DXS1059 wiązały się z krótszym czasem przeżycia chorych, natomiast LOH w markerze D11S2017 wpływało korzystnie na czas przeżycia. Natomiast takie parametry jak *grade*, postać histologiczna guza, wiek pacjentek, obecność mutacji *BRCA1/2* czy ogólna liczba utrat nie miały wpływu na długość przeżycia.

Zastosowanie algorytmu genetycznego pozwoliło na wyłonienie z całej puli zmiennych niezależnych tych, które najlepiej opisują daną cechę. Przy określeniu stopnia złośliwości histopatologicznej największe znaczenie mają takie zmienne jak: stopień zaawansowania klinicznego nowotworu a także utrata markerów: D3S3611, D11S1778, DXS8105, DXS6807, DXS8095, DXS6875, DXS1213, DXS1161, DXS454, DXS8103 w guzach o wysokim stopniu złośliwości histologicznej. Natomiast w grupie chorych nosicieli mutacji największe znaczenie mają LOH we wszystkich markerach z chromosomu 3 oraz DXS6785, DXS1213, DXS1161, DXS8076, DXS1193 i wysoki *grade* guza.



## 7. Dyskusja

Technika LOH jest powszechnie wykorzystywana do mapowania i identyfikacji nowych genów supresorowych (TSG). Dzięki tej metodzie zidentyfikowano dotychczas różne geny supresorowe zaangażowane w etiologię wielu nowotworów np. gen *DMBT1* w złośliwych nowotworach mózgu (Mollenhauer i wsp, 1997, Liu i wsp, 2002). Praktycznie w każdej publikacji dotyczącej analizy LOH w rakach jajnika opisywane są nowe regiony chromosomowe, w których częściej dochodzi do utraty jednego z alleli mikrosatelitarnych. Dotychczas opisano bardzo wiele takich regionów zlokalizowanych między innymi w chromosomach: 1p, 3p, 4p, 7p, 8q, 12q, 16p, 17p i q, 19q, Xp i q (Liu i wsp, 2002, Cliby i wsp, 1993). W wielu doniesieniach pojawiają się też informacje o korelacji pomiędzy utratami w danym regionie chromosomowym a wybranymi parametrami klinicznymi np. LOH w 1p pomiędzy markerami D1S211 i D1S190 związane jest z agresywnym przebiegiem choroby w endometrioidalnym typie raka jajnika (Arlt i wsp 1996). Niestety w większości są to pojedyncze doniesienia, niepotwierdzone w innych publikacjach. Być może jest to spowodowane faktem, iż badania zazwyczaj przeprowadzane były na niewielkiej liczbie przypadków, z zastosowaniem różnych metod analizy LOH. W piśmiennictwie brakuje prac, w których analizę utraty heterozygotyczności przeprowadzono zarówno w sporadycznych jak i dziedzicznych przypadkach raka jajnika. Dlatego też interesującym wydało się przeprowadzenie takich badań w dużej grupie pacjentek z rakiem jajnika, w tym również nosicielek mutacji w genach *BRCA1/2*, których wyniki są przedmiotem niniejszej rozprawy.

### *Chromosom 3.*

Ponieważ w literaturze często wymieniano *locus* 3p25-26 jako region charakteryzujący się wysokim odsetkiem LOH w raku jajnika, przeprowadzono analizę utraty heterozygotyczności czterech markerów zlokalizowanych w prążku 3p25-26 oraz jednego markera z 3q27. Zaobserwowano, iż utraty heterozygotyczności dotyczą głównie markerów z ramion krótkich chromosomu 3. Rimessi i wsp. (1994) w doświadczeniach na liniach komórkowych raka

jajnika zauważyli, że wprowadzenie prawidłowego chromosomu 3 do linii komórek nowotworowych jajnika powodowało zahamowanie wzrostu komórek oraz supresję nowotworu. W liniach komórek nowotworowych monoallelicznych pod względem chromosomu 3, transfer chromosomu 3 z komórki prawidłowej powodował powstawanie guzów, w których tracone były regiony 3p23-24.2 oraz 3p21.1-21.2. Na tej podstawie Rimessi i wsp. wysnuli przypuszczenie, iż w tych regionach muszą być zlokalizowane ważne geny supresorowe (Rimessi i wsp, 1994). Wyniki tych doświadczeń zostały potwierdzone również w innych niezależnych doniesieniach (Cody i wsp, 2007, Uzawa i wsp, 1995, Fullwood i wsp, 1999).

W 2001 roku ukazała się publikacja, w której autorzy przeprowadzili nieparametryczną analizę sprzężeń oraz analizę LOH u chorych na raka jajnika z obciążonym wywiadem rodzinnym, w tym nosicielek mutacji w genach *BRCA1/2* (Sekine i wsp, 2001). Wyniki ich badań wskazują region 3p22-25 jako prawdopodobną lokalizację nowego genu predysponującego do rodzinnych zachorowań na raka jajnika. Autorzy wskazują *locus* pomiędzy dwoma markerami, D3S1597 oraz D3S3611, wskazane przez analizę sprzężeń, w których odnotowano wysoką częstość LOH u pacjentek *BRCA* negatywnych, jako lokalizację nowego genu (Sekine i wsp, 2001). W niniejszej pracy te dwa markery również dominowały jeżeli chodzi o częstość zjawiska LOH. Nie zaobserwowano jednak korelacji pomiędzy obecnością LOH w *loci* tych markerów a obecnością mutacji *BRCA1/2* bądź jej brakiem, być może jest to spowodowane zbyt małą grupą pacjentek będących nosicielkami mutacji *BRCA1/2*. Wykazano natomiast znamiennej statystycznie związek pomiędzy utratami heterozygotyczności w markerze D3S1597 a wiekiem pacjentek ( $p=0,048$ ). Do utrat tego markera częściej dochodziło do u pacjentek, które zachorowały po 60 roku życia, a jak wiadomo w przypadku rodzinnych agregacji zachorowań na raka jajnika, nowotwór zazwyczaj rozwija się w młodszym wieku. Pośrednio więc potwierdzałoby to wyniki otrzymane przez Sekine i wsp, 2001). Niedawno zmapowano gen w obrębie którego znajduje się marker D3S1597. Jest to gen *CAV3* kodujący białko wchodzące w skład kaweoli (*caveolae*) ulegający ekspresji głównie w komórkach mięśniowych (Tang i wsp, 1996). Syed i wsp. (2005) jako pierwsi zwrócili uwagę na białka z rodziny kaweolin, które regulowane poziomem progesteronu mogą być zaangażowane

w patogenezę raka jajnika.

Marker D3S3611 zdecydowanie wyróżniał się on pod względem częstości LOH wśród markerów z chromosomu 3. Marker ten znajduje się w obrębie genu *ATP2B2* kodującego ATPazę zaangażowaną w utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów wapnia (Van Poucke i wsp, 1997). Niestety w literaturze brak danych potwierdzających udział genu *ATP2B2* w karcynogenezie raka jajnika. Interesujące wydaje się, iż wysoki odsetek utrat praktycznie dotyczył tylko markerów D3S3611 i D3S1597, które ze sobą sąsiadują i których istotną rolę w etiologii raka jajnika należałoby potwierdzić.

Również uzasadnienie związku pomiędzy utratą heterozygotyczności markera D3S1263 w guzach o znacznych cechach atypii trudno poprzeć danymi literaturowymi. W pracach kilku zespołów zaobserwowano częstsze utraty markerów zlokalizowanych w 3p, w tym w prążku 3p25 w guzach o zaawansowanym stopniu złośliwości histologicznej (Cheng i wsp, 1996, Zheng i wsp, 1991, Lounis i wsp, 1998). W przeciwieństwie do nich, inny zespół zaobserwował częstsze zjawisko LOH w guzach wysoko zróżnicowanych (Dodson i wsp, 1993).

### *Chromosom 11.*

Podobnie jak LOH w chromosomie 3, utraty heterozygotyczności w chromosomie 11 są często opisywane w różnych nowotworach. Postuluje się istnienie wielu potencjalnych genów supresorowych zlokalizowanych w chromosomie 11 związanych z nowotworami takimi jak: rak piersi, płuc, jelita grubego oraz rak jajnika (Stronach i wsp, 2003). Częste utraty heterozygotyczności w raku jajnika obserwowane są w prążku 11p15 oraz 11q23-q25 (Gabra i wsp, 1996, Gabra i wsp, 1995, Lu i wsp, 1997, Stronach i wsp, 2003). Wybrane w niniejszej pracy markery mikrosatelitarne znajdowały się w prążku 11q22-23, w tym jeden w *locus* znanego genu supresorowego *ATM*. Tym razem wzór utrat nie był tak oczywisty jak w przypadku chromosomu 3, albowiem częstość LOH analizowanych markerów niewiele się różniła między sobą. Trudno wyróżnić jeden marker, w którym zjawisko utraty heterozygotyczności zdecydowanie dominowałoby nad pozostałymi. Interesujący jest fakt, iż w markerze D11S2179 zlokalizowanym wewnątrz genu

*ATM*, częstość obserwowanych utrat jest znacznie niższa niż w pozostałych markerach, mimo iż należy spodziewać się, że będzie odwrotnie. Utraty heterozygotyczności w *locus* genu *ATM* są zjawiskiem częstym w nowotworach jajnika (Liu i wsp, 2002, Koike i wsp, 1999). Obserwowana w niniejszej pracy niższa częstość LOH w tym locus być może spowodowane jest to niewielką liczbą przypadków informacyjnych, bądź też niską heterozygotycznością analizowanego markera. Jednakże Launonen i wsp. (1998) również zauważyli niższą częstość utrat heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w genie *ATM* w stosunku do innych markerów zlokalizowanych w 11q23. Na tej podstawie stwierdzili, że *ATM* nie odgrywa kluczowej roli w rozwoju raka jajnika.

W guzach w zaawansowanym stadium złośliwości histologicznej bardzo często obserwuje się utraty markerów z 3p oraz 11q (Zheng i wsp, 1991). W niniejszej pracy znamiennej statystycznie związek pomiędzy LOH a guzami o wysokim stopniu atypii udało się zaobserwować tylko w jednym z markerów z chromosomu 3 (D3S1263) i jednym z chromosomu 11 (D11S1324,  $p=0,038$ ) oraz guzami, w których przynajmniej w jednym *loci* z 11q wystąpiło LOH. Ponieważ utraty heterozygotyczności markerów z 3p i 11q są zjawiskiem częstym postuluje się, iż geny zlokalizowane na tych chromosomach muszą odgrywać ważną rolę w rozwoju raka jajnika (Ehlen i wsp, 1990).

### *Chromosom X.*

Ponieważ kobiety posiadają dwa chromosomy płci X, od dłuższego czasu pojawiają się doniesienia o zaangażowaniu tych chromosomów w jego karcynogenezę raka jajnika (Hodgall i wsp, 2004, Cheng i wsp, 1996, Shelling i wsp, 2001). Utraty materiału genetycznego z chromosomu X są częstym zjawiskiem w guzach jajnika (Thompson i wsp, 1994, Hodgall i wsp, 2004). Wysoki odsetek LOH odnotowywano w Xp21 (Yang-Feng i wsp, 1993) a także w markerze mikrosatelitarnym z Xq, zlokalizowanym w pobliżu genu *AR* kodującego receptor dla androgeny (Cheng i wsp, 1996).

Buekers i wsp. (2000) przeprowadzili analizę LOH 90 guzów jajnika. Zauważyli, iż w *locus* Xp22.2-3 do utrat heterozygotyczności dochodzi częściej niż w innych analizowanych przez niego *loci*. Utraty markera DXS6807 zlokalizowanego w Xp22.3 prawie dwa razy częściej występowały w guzach

nosicielek mutacji w genie *BRCA1*. W przypadku analizowanych w niniejszej pracy markerów z Xp22, LOH w tym markerze również odnotowywane było znacznie częściej w guzach tych kobiet. LOH w *locus* DXS6807 wystąpiło w 22% wszystkich przypadków informacyjnych w porównaniu do 16% DXS8095 i 12% DXS8105 - nie osiągnęło jednak progu istotności statystycznej. Niektórzy autorzy sugerują, że produkt genu zlokalizowanego w Xp22.2-3 wchodzi w interakcje z białkiem BRCA1, bądź też modyfikuje jego ekspresję w guzach jajnika kobiet z mutacją w genie *BRCA1* (Buekers i wsp, 2000). Marker DXS6807 znajduje się w obrębie genu *RA31* i jak dotychczas nie potwierdzono jego współdziałania z genem *BRCA1*, ani też udziału w onkogenezie raka jajnika (Jawaheer i wsp, 2001). Jednakże to nie w markerze DXS6807 stwierdzono związek istotny statystycznie między utratami a obecnością mutacji w *BRCA1/2*. Zależność taka wystąpiła w przypadku dwóch markerów z Xp22: DXS8095 ( $p=0,014$ ) i DXS8015 ( $p=0,013$ ) oraz jednego z Xq12: DXS6785 ( $p=0,024$ ). W *loci* tych markerów nie zidentyfikowano dotąd żadnych genów. Być może znajdują się tam nieznane geny bądź sekwencje, z którymi białko BRCA1 wchodzi w interakcje. W ciągu ostatnich kilku lat coraz częściej pojawiają się doniesienia o zaangażowaniu białka BRCA1 w regulację ekspresji genów zlokalizowanych na chromosomie X, znajdujących się między innymi w prążku Xp11 (Ganesan i wsp, 2004, Jazaeri i wsp, 2004). Prawdopodobnie obecność prawidłowego białka BRCA1 jest konieczne, aby utrzymać odpowiedni poziom kondensacji chromatyny inaktywowanego chromosomu X poprzez kolokalizację z XIST RNA pokrywającym nieaktywny chromosom X (Silver i wsp, 2002, Ganesan i wsp, 2004, Jazaeri i wsp, 2004).

Wraz z progresją raka jajnika w komórkach nowotworowych wzrasta ilość błędów genetycznych. Akumulacja mutacji oraz rearanżacji genomowych powinna odzwierciedlać się w częstotliwości utrat (Liu i wsp, 2002, Iwabuchi i wsp, 1995). W niniejszej pracy zaobserwowano, że w guzy, w których w trzech lub więcej markerach odnotowano LOH, były guzami o niskim zróżnicowaniu histologicznym (G3,  $p=0,00073$ ). Znalazienie markerów charakterystycznych dla danego stadium raka jajnika jest bardzo ważne. Umożliwi to wdrażanie terapii celowanych oraz pozwoli na monitorowanie rozwoju choroby. W guzach jajnika utraty regionu Xq25-26.1 wydają się być związane z progresją guza i wykrywane są w zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu (Choi i wsp,

1997). W analizowanych markerach, taką zależność zaobserwowano w przypadku DXS8095 ( $p=0,047$ ), DXS8105 ( $p=0,041$ ) oraz DXS1193 ( $p=0,033$ ). LOH w tych *loci* występuje częściej w guzach o znacznych cechach atypii, potwierdzając tezę, że jest to krytyczne wydarzenie w progresji guza, a nie w jego powstawaniu (Iwabuchi i wsp, 1995).

Stopień złośliwości histologicznej (*grade*), zaawansowanie kliniczne choroby (FIGO), wiek pacjentek oraz ploidia DNA to tylko niektóre z czynników rokowniczych w raku jajnika (Averette i wsp, 1995, Kristensen i wsp, 2003, Manyś i wsp, 2002). Nadal trwają poszukiwania molekularnych czynników rokowniczych. Dotychczas powiązано nadekspresję genów *TP53* oraz *ERBB2* (*HER-2*) w guzach jajnika z niekorzystnym rokowaniem oraz skróceniem 5-letniego czasu przeżycia chorych (Camilleri-Broët i wsp, 2004, Dogan i wsp, 2005, Kupryjańczyk i wsp, 2005). LOH w DXS454 zostało uznane za niezależny czynnik rokowniczy w raku jajnika, związany z krótszym czasem przeżycia chorych (Hodgall i wsp, 2004). W niniejszej pracy nie udało się potwierdzić tej zależności. Prawdopodobnie spowodowane jest to różnymi technikami, jakie zostały zastosowane do analizy LOH oraz doborom grupy chorych. Spośród wszystkich markerów, które analizowano żaden nie wpływał na czas przeżycia. Statystyczne różnice pomiędzy czasem przeżycia odnotowano pomiędzy grupą pacjentek, u których w guzach utraty heterozygotyczności występowały często ( $\geq 3$  LOH/guz) a pacjentkami, w których guzach utraty występowały rzadko ( $\leq 2$  LOH/guz), gdzie dłuższe przeżycia zaobserwowano w grupie z licznymi LOH ( $p=0,029$ ). Spodziewaliśmy się dokładnie odwrotnej zależności, zazwyczaj liczne utraty w guzie związane są z krótszym czasem przeżycia chorych. Zależność taka może być zupełnie przypadkowa, spowodowana zbyt krótkim czasem obserwacji chorych, jak również dużą liczbą przypadków nieinformacyjnych wpływających na analizę statystyczną. Dalsze obliczenia nie potwierdziły tej zależności wskazując FIGO ( $p=0,000013$ ) oraz markery D3S1263 ( $p=0,037$ ), D11S2017 ( $p=0,028$ ), DXS8095 ( $p=0,0092$ ), DXS8029 ( $p=0,0146$ ), DXS8076 ( $p=0,032$ ), oraz DXS1059 ( $p=0,0026$ ) jako niezależne czynniki rokownicze wpływające na czas przeżycia. W dostępnej literaturze nie znalaziono doniesień o wpływie utrat heterozygotyczności w prążku 3p25 na czas przeżycia chorych z rakiem jajnika.

Niestabilność genomowa w subtelerowym regionie 11q związana jest z gorszym rokowaniem i skróceniem czasu przeżycia, a niestabilność genomowa 11q14 wraz z zachowaniem heterozygotyczności w prążku 11q22 związana jest z korzystnym rokowaniem (Gabra i wsp, 1995). W innej pracy wykazano znamiennej statystycznie związek pomiędzy LOH w *locus* 11q23.3 a krótszym czasem przeżycia pacjentek (Liu i wsp, 2002, Gabra i wsp, 1996). W przypadku markera D11S2017 utraty heterozygotyczności wpływały korzystnie na czas przeżycia. W pracy Hansen i wsp. (1998) podobną zależność zaobserwowano w przypadku utrat heterozygotyczności w 16q23.2-24.2 w raku piersi, LOH w tym *locus* zostało uznane za niezależny czynnik rokowniczy związany z dłuższym czasem przeżycia oraz wydłużeniem czasu pomiędzy kolejnymi wznowami nowotworu. Autorzy tej publikacji sugerują, że być może w 16q znajduje się gen bądź geny supresorowe, do których utraty dochodzi na wczesnym etapie rozwoju nowotworu. Wraz z tymi genami utracie miałyby ulegać również gen indukujący powstawanie przerzutów lub też gen kontrolujący ten proces.

W poniższej pracy badaniem LOH zostało objętych pięć regionów zarówno z ramion krótkich jak i długich chromosomu X. Okazało się, że tylko cztery spośród czternastu markerów zostało zakwalifikowanych jako niezależne czynniki rokownicze wpływające na długość przeżycia. Zaledwie w kilku pozycjach w piśmiennictwie opisano korelację pomiędzy utratami markerów z chromosomu X a czasem przeżycia chorych z rakiem jajnika. Uważa się, że utraty heterozygotyczności w Xq12 oraz Xq25-26 związane są z gorszymi rokowaniami, jednakże tylko LOH w *locus* markera DXS454 (Xq21-23) zostało uznane za niezależny czynnik rokowniczy (Nakayama i wsp, 2004, Hodgall i wsp, 2004, Choi i wsp, 1997). Być może należałoby przeprowadzić dodatkowe badania prospektywne, aby potwierdzić bądź wykluczyć przypadkowość otrzymanych wyników.

W niniejszej pracy po raz pierwszy zastosowano odmianę sieci neuronowych do analizy wyników LOH. Algorytm genetyczny przypomina zjawisko ewolucji biologicznej, z całej puli zmiennych umożliwia wyłonienie tych, które w najlepszy sposób charakteryzują daną populację (Stanisz 2002, Stanisz 1998). Postanowiono zastosować algorytm genetyczny, aby z grupy wszystkich zmiennych wyłonić te, które najlepiej będą charakteryzowały złośliwość

histologiczną guza oraz guzy pochodzące do nosicielek mutacji *BRCA1/2*. Wszystkie zmienne charakterystyczne dla tych grup są zestawione w tabeli 19.

Tabela 19. Czynniki charakteryzujące stopień złośliwości histologicznej guza oraz guzy pochodzące do nosicielek mutacji *BRCA1/2* wskazane przez algorytm genetyczny.

	Parametry kliniczne	Markery z chromosomu 3	Markery z chromosomu 11	Markery z chromosomu X	Błąd walidacyjny sieci
Stopień złośliwości histologicznej guza ( <i>grade</i> )	FIGO	<b>D3S3611</b>	D11S1778	DXS8105 DXS6807 DXS8095 <b>DXS6875</b> <b>DXS1213</b> <b>DXS1161</b> DXS454 DXS8103	0,029
Guzy nosicielek mutacji w genach <i>BRCA1/2</i>	<i>grade</i>	D3S1304 D3S1597 <b>D3S3611</b> D3S1263 D3S1580	-	<b>DXS6785</b> <b>DXS1213</b> <b>DXS1161</b> DXS1193	0,49

Pogrubioną czcionką zostały zaznaczone te markery, w których utraty heterozygotyczności są charakterystyczne zarówno dla stopnia złośliwości histologicznej guza jak i guzów pochodzących od nosicielek mutacji w *BRCA1/2*.

W piśmiennictwie coraz częściej pojawia się stwierdzenie, że mechanizm prowadzący do rozwoju nowotworu u nosicielek mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* jest odmienny niż w przypadku nowotworów sporadycznych (Jazaeri i wsp, 2002). W komórkach nowotworowych posiadających germinálną mutację *BRCA1/2* zarówno profil ekspresji genów jak i wzór utrat heterozygotyczności jest inny niż w komórkach sporadycznych nowotworów (Jazaeri i wsp, 2002, Oldenburg i wsp, 2006). W niniejszej pracy zauważono, iż w guzach pochodzących od nosicielek mutacji do utraty heterozygotyczności dochodzi częściej niż w guzach sporadycznych. Częstsze występowanie LOH w guzach dziedzicznych może być spowodowane utratą funkcji genów *BRCA1/2*, które zaangażowane są w utrzymanie stabilności genomu oraz naprawę pęknięć DNA (Welsch i wsp, 2002). Również obserwowany wzór utrat jest różny od



wzoru charakterystycznego dla raków sporadycznych, różnice te są szczególnie widoczne w przypadku utraty heterozygotyczności markerów z chromosomu X gdzie do utrat dochodziło znacznie częściej w guzach nosicielek mutacji.

## 8. Wnioski

1. Wysoka częstość utrat heterozygotyczności w *loci* markerów zlokalizowanych w chromosomie płci X: DXS8095, DXS8015 oraz DXS6785 w guzach pochodzących od nosicielek germinalnych mutacji w genach *BRCA1/2* wskazuje na obecność w tych regionach chromosomu nieznanymi czynnikami modyfikującymi proces transformacji nowotworowej.
2. Wysoka częstość utrat heterozygotyczności w chromosomie Xq25-26 występuje znamienne częściej w guzach o znacznych cechach atypii, co potwierdza pogląd, że zmiany te związane są z histologiczną progresją nowotworu.
3. Odmienne profile utrat heterozygotyczności w guzach nosicielek germinalnych mutacji *BRCA1/2* w porównaniu do guzów sporadycznych wskazuje, iż w trakcie rozwoju nowotworu u nosicielek tych mutacji inaktywacji ulegają inne geny aniżeli w przypadku sporadycznych raków jajnika.
4. Wyższa częstość LOH w guzach pacjentek będących nosicielkami germinalnych mutacji w genach *BRCA1/2*, w porównaniu do guzów pacjentek bez mutacji, są zgodne z danymi literaturowymi i świadczą o znaczącej roli genów *BRCA1/2* w utrzymaniu stabilności genomu.
5. Częste utraty heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w chromosomie 3p25-26 wskazują na zaangażowanie tego regionu w patogenezę raka jajnika, w którym prawdopodobnie uczestniczą nieznane geny supresorowe.
6. Częste utraty heterozygotyczności w genach kodujących kaweolinę 3 (*CAV3*) i ATPazę wapniową błony cytoplazmatycznej (*ATP2B2*) wskazują na potencjalną rolę tych genów w rozwoju spontanicznego raka jajnika.
7. Nie potwierdza się znaczenia LOH markera DXS454 jako niezależnego czynnika rokowniczego związanego z krótszym czasem przeżycia u chorych na raka jajnika.

## 9. Streszczenie

Celem pracy była ocena związku pomiędzy utratą heterozygotyczności markerów mikrosatelitarnych zlokalizowanych w chromosomach 3, 11 oraz X w guzie nowotworowym a wybranymi parametrami histopatologicznymi i klinicznymi w dwóch grupach chorych kobiet z rakiem jajnika: z obecnością oraz brakiem germinalnych mutacji genów *BRCA1/2*.

Materiał do badań stanowił DNA wyizolowany z krwi obwodowej oraz tkanki guzów jajnika 165 pacjentek z nieselekcjonowanym rakiem jajnika. U wszystkich pacjentek, w ramach wcześniejszych projektów, przeprowadzono analizę wybranych germinalnych mutacji genów *BRCA1/2*.

Badaniem LOH objęto 23 markery mikrosatelitarne zlokalizowane w chromosomach 3 (3p25-26: D3S1304, D3S1597, D3S3611, D3S1263, 3q27: D3S1580), 11 (D11S1324, D11S2017, D11S2179, D11S1778) oraz X (Xp22: DXS8105, DXS6807, DXS8095, Xq12: DXS6785, DXS8029, DXS1213, DXS1161, DXS1160, Xq21: DXS8076, DXS454, Xq23: DXS1059, Xq28: DXS1193, DXS8069, DXS8103). Analiza utraty heterozygotyczności została przeprowadzona z zastosowaniem sekwenatora automatycznego ABI PRISM 310 oraz programów ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0 i ABI PRISM GeneScan Analysis Program v 3.1. Do analizy statystycznej zastosowano oprogramowanie STATISTICA for Windows 7.1 firmy StatSoft.

Analizą LOH pięciu markerów z chromosomu 3 objęto 825 próbek. Utratę heterozygotyczności zaobserwowano w 105 przypadkach (20%). W 420 nie zaobserwowano zjawiska LOH (80%). Markerami, w których odnotowano największą liczbę utrat były D3S3611 (25%) oraz D3S1597 (23%). Najliczniej reprezentowane w badanej grupie były guzy, w których zjawisko LOH występowało tylko w jednym z badanych markerów. Zaobserwowana wysoka częstość utrat heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w 3p25-26 wskazuje na istnienie w tym regionie nie poznanych jeszcze genów supresorowych odgrywających istotną rolę w karcynogenezie raka jajnika. Częste utraty heterozygotyczności w genach *CAV3* i *ATP2B2* wskazują na potencjalną rolę tych genów w rozwoju spontanicznego raka jajnika.

Badanie utraty heterozygotyczności czterech markerów w chromosomie 11 przeprowadzono w grupie 660 próbek. Wyniki informacyjne uzyskano w 454 przypadkach (69%), w tym w 19% doszło do utraty heterozygotyczności. Najwięcej utrat dotyczyło markera D11S1778 (22% guzów), zaś w markerach D11S2017 i D11S1324 odnotowano LOH w 20% guzów. W żadnym z przypadków nie odnotowano utraty wszystkich markerów z chromosomu 11.

W przypadku chromosomu X analizą zostało objętych 14 markerów mikrosatelitarnych. Wykonano łącznie 2310 oznaczeń, otrzymano 1419 (61%) wyników informacyjnych. Utratę heterozygotyczności odnotowano w 19% przypadków informacyjnych. LOH najliczniej (27%) występowało w markerach DXS6785 i DXS1193 zlokalizowanych odpowiednio w Xq12 i Xq28. Aż w 71% badanych guzów doszło do utraty przynajmniej jednego markera.

Spośród wszystkich analizowanych markerów mikrosatelitarnych tylko w przypadku markerów z chromosomu X (DXS8095, DXS8015, DXS6785) wykazano związek pomiędzy obecnością LOH i germinalnych mutacji w *BRCA1/2* wskazujący na obecność nieznanymi czynników modyfikujących proces transformacji nowotworowej. W guzach pacjentek będących nosicielkami germinalnych mutacji w genach *BRCA1/2* obserwowano różny wzór utrat heterozygotyczności w porównaniu do guzów sporadycznych. LOH występowała częściej w guzach nosicielek, co szczególnie dotyczy markerów zlokalizowanych w chromosomie X. Natomiast w markerach zlokalizowanych w chromosomie 11 zjawisko LOH występowało częściej w rakach sporadycznych.

W przypadku nowotworów dziedzicznych proces karcynogenezy przebiega prawdopodobnie odmiennym torem niż w przypadku raków sporadycznych. Częstsze utraty heterozygotyczności w guzach nosicielek mutacji potwierdzają kluczową rolę białek *BRCA1/2* w utrzymaniu stabilności genomu.

## 10. Abstract

The aim of the study was to determine the correlation between loss of heterozygosity of microsatellite markers localized in chromosomes 3, 11, X and selected clinical and histopathological parameters within two groups of patients with ovarian cancer: with or without mutations in *BRCA1/2* genes.

DNA was obtained from 165 ovarian tumors and matching peripheral blood samples. All the patients were examined for presence of mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes during previous projects.

In this study, we analyzed 23 microsatellite markers localized in chromosomes 3 (3p25-26: D3S1304, D3S1597, D3S3611, D3S1263, 3q27: D3S1580), 11 (D11S1324, D11S2017, D11S2179, D11S1778) and X (Xp22: DXS8105, DXS6807, DXS8095, Xq12: DXS6785, DXS8029, DXS1213, DXS1161, DXS1160, Xq21: DXS8076, DXS454, Xq23: DXS1059, Xq28: DXS1193, DXS8069, DXS8103). The LOH analyses were performed by ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0 and ABI PRISM GeneScan Analysis Program v 3.1. The statistical analysis was performed using STATISTICA *for Windows* 7.1 (StatSoft, Poland).

We evaluated 825 samples from 165 patients with ovarian carcinoma for five 3-chromosome markers. LOH was shown in 105 samples (20%). The highest LOH frequency was observed at markers D3S3611 (25%) and D3S1597 (23%). High LOH frequency observed at 3p25-26 indicates the existence of unknown tumor suppressor genes involved in ovarian carcinogenesis. Frequent LOH present at *CAV3* and *ATP2B2* loci proves the potential role of these genes in sporadic cancer development.

Four microsatellite markers from chromosome 11 were investigated in 660 samples. LOH was present in 19% of informative cases (n=454/660, 69%). 22% of tumors showed LOH at D11S1778, in 20% of tumors LOH at D11S2017 and D11S1324 was present.

Out of fourteen X-chromosome microsatellite markers, 1419 (61%) informative cases were obtained. Among them, 19% showed LOH. The most frequent LOH (27%) was observed at markers DXS6785 and DXS1193, localized at Xq12 and Xq28 respectively. The proportion of tumors with at least one LOH of X-chromosome markers was 71%.

Statistical association between LOH and presence of *BRCA1/2* mutations was found only at three markers. All of them were localized on X chromosome (DXS8095, DXS8015, DXS6785). This indicates undefined factors that can modify ovarian carcinogenesis in *BRCA1/2* mutation carriers. The LOH pattern obtained from tumors of *BRCA1/2* mutation carriers was distinct from sporadic tumors. The LOH frequency was higher in hereditary tumors, particularly in X-chromosome markers. However, sporadic cancers displayed higher than hereditary cancers LOH rate at markers localized on 11 chromosome.

Presumably, hereditary carcinogenesis process involves different pathways than development of sporadic ovarian cancer. Higher LOH frequency in tumors among *BRCA1/2* carriers confirm crucial role of BRCA1 and BRCA2 proteins in maintaining genome integrity.

**11. Literatura**

1. Abdollahi A, Bao R, Hamilton TC.: LOT1 is a growth suppressor gene downregulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein. *Oncogene*. 1999; 18: 6477–6487.
2. Abdollahi A.: LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. *J Cell Physiol*. 2007; 210: 16-25.
3. An HJ, Kim KI, Kim JY, Shim JY, Kang H, Kim TH, Kim JK, Jeong JK, Lee SY, Kim SJ.: Microsatellite instability in endometrioid type endometrial adenocarcinoma is associated with poor prognostic indicators. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31: 846-853.
4. Arlt MF, Herzog TJ, Mutch DG, Gersell DJ, Liu H, Goodfellow PJ.: Frequent deletion of chromosome 1p sequences in an aggressive histologic subtype of endometrial cancer. *Hum Mol Genet*. 1996; 5: 1017-1021.
5. Averette HE, Janicek MF, Menck HR.: The National Cancer Data Base report on ovarian cancer. American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* 1995; 76: 1096-1103.
6. Bayani J, Brenton JD, Macgregor PF, Beheshti B, Albert M, Nallainathan D, Karaskova J, Rosen B, Murphy J, Laframboise S, Zanke B, Squire JA.: Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and expression microarrays. *Cancer Res*. 2002; 62: 3466-3476.
7. Bertwistle D, Ashworth A.: Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8: 14-20.
8. Buekers TE, Lallas TA, Buller RE.: Xp22.2-3 Loss of Heterozygosity Is Associated with Germline BRCA1 Mutation in Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol*. 2000; 76: 418–422.
9. Camilleri-Broët S, Hardy-Bessard AC, Le Tourneau A, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, Bain S, Orfeuvre H, Audouin J, Pujade-Lauraine E.: HER-2 overexpression is an independent marker of poor

prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *Ann Oncol* 2004; 15: 104-112.

10. Canevari S, Gariboldi M, Reid JF, Bongarzone I, Pierotti MA.: Molecular predictors of response and outcome in ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 60: 19-37.
11. Chenevix-Trench G, Kerr J, Hurst T et al.: Analysis of loss of heterozygosity and KRAS2 mutations in ovarian neoplasms: clinicopathological correlations. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 18: 75–83.
12. Cheng PC, Gosewehr JA, Kim TM, Velicescu M, Wan M, Zheng J, Felix JC, Cofer KF, Luo P, Biela BH, Godorov G, Dubeau L.: Potential role of the inactivated X chromosome in ovarian epithelial tumor development. *J Natl Cancer Inst* 1996; 17; 88: 510-518.
13. Choi C, Cho S, Horikawa I, Berchuck A, Wang N, Cedrone E, Jhung SW, Lee JB, Kerr J, Chenevix-Trench G, Kim S, Barrett JC, Koi M.: Loss of heterozygosity at chromosome segment Xq25-26.1 in advanced human ovarian carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 20: 234-242.
14. Christensen M, Sunde L, Bolund L, Orntoft TF.: Comparison of three methods of microsatellite detection. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999; 59: 167-178.
15. Cliby W, Ritland S, Hartmann L, Dodson M, Halling KC, Keeney G, Podratz KC, Jenkins RB.: Human epithelial ovarian cancer allelotype. *Cancer Res*. 1993; 15: 2393-2398.
16. Cody NA, Ouellet V, Manderson EN, Quinn MC, Filali-Mouhim A, Tellis P, Zietarska M, Provencher DM, Mes-Masson AM, Chevrette M, Tonin PN.: Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene* 2007; 26: 618-632.
17. Cramer DW, Hutchison GB, Welch WR, Scully RE, Ryan KJ.: Determinants of ovarian cancer risk. I. Reproductive experiences and family history. *J Natl Cancer Inst*. 1983; 71: 711-716.
18. Cramer DW, Welch WR.: Determinants of ovarian cancer risk. II.



- Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1983; 71: 717-721.
19. Cvetkovic D.: Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 7: 68.
  20. Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ.: Ever since Knudson. *Trends Genet.* 2001; 17: 569-573.
  21. Dodson MK, Cliby WA, Xu HJ.: Evidence of functional RB protein in epithelial ovarian carcinomas despite loss of heterozygosity at the RB locus. *Cancer Res.* 1994; 54: 610–613.
  22. Dodson MK, Hartmann LC, Cliby WA, DeLacey KA, Keeney GL, Ritland SR, Su JQ, Podratz KC, Jenkins RB.: Comparison of loss of heterozygosity patterns in invasive low-grade and high-grade epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 1993; 53: 4456-4460.
  23. Dogan E, Saygili U, Tuna B, Gol M, Gürel D, Acar B, Koyuncuoğlu M.: p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: A multivariate analysis. *Gynecol Oncol.* 2005; 97: 46-55.
  24. Eccles DM, Cranston G, Steel CM, Nakamura Y and Leonard RC.: Allele losses on chromosome 17 in human epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene.* 1990; 5: 1599–1601.
  25. Eccles DM, Cranston G, Steel CM, Nakamura Y, Leonard RC.: Allele losses on chromosome 17 in human epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene.* 1990; 5: 1599-1601
  26. Ehlen T, Dubeau L.: Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q and 11p in human ovarian carcinomas. *Oncogene.* 1990; 5: 219-223.
  27. ElShamy WM, Livingston DM.: Identification of BRCA1-IRIS, a BRCA1 locus product. *Nature Cell Biol.* 2004; 6: 954-967.
  28. Fathalla MF.: Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 1971; 17: 163.
  29. Fazili Z, Sun W, Mittelstaedt S, Cohen C and Xu XX.: Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene.* 1999; 18: 3104–3113.

30. Fields MM, Chevlen E.: Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs*. 2006; 10: 77-81.
31. Filmus J.: Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology*. 2001; 11: 19R-23R.
32. Fraser JA, Reeves JR, Stanton PD, Black DM, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM.: A role for BRCA1 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer*. 2003; 88: 1263-1270.
33. Fullwood P, Marchini S, Rader JS, Martinez A, Macartney D, Broggin M, Morelli C, Barbanti-Brodano G, Maher ER, Latif F.: Detailed genetic and physical mapping of tumor suppressor loci on chromosome 3p in ovarian cancer. *Cancer Res*. 1999; 15: 4662-4467.
34. Gabra H, Taylor L, Cohen BB, Lessels A, Eccles DM, Leonard RC, Smyth JF, Steel CM.: Chromosome 11 allele imbalance and clinicopathological correlates in ovarian tumours. *Br J Cancer*. 1995; 72: 367-375.
35. Gabra H, Watson JEV, Taylor KJ, MacKay J, Leonard RCF, Steel CM, Porteous DJ, Smyth JF.: Definition and refinement of a region of loss of heterozygosity at 11q23.3-q24.3 in epithelial ovarian-cancer associated with poor prognosis. *Cancer Res*. 1996; 56: 950–954.
36. Ganesan S, Silver DP, Drapkin R, Greenberg R, Feunteun J, Livingston DM.: Association of BRCA1 with the inactive X chromosome and XIST RNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004; 29: 123-128.
37. Gilks CB, Alkushi A, Yue JJ, Lanvin D, Ehlen TG, Miller DM.: Advanced-stage serous borderline tumors of the ovary: a clinicopathological study of 49 cases. *Int J Gynecol Pathol*. 2003; 22: 29-36.
38. Godwin AK, Testa JR, Hamilton TC.: The biology of cancer development. *Cancer*. 1993; 71: 530-536.
39. Górski B, Byrski T, Huzarski T, Jakubowska A, Menkiszak J, Gronwald J, Pluzańska A, Bebenek M, Fischer-Maliszewska L,

- Grzybowska E, Narod SA, Lubiński J.: Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 1963-1968.
40. Hansen LL, Yilmaz M, Overgaard J, Andersen J, Kruse TA.: Allelic loss of 16q23.2-24.2 is an independent marker of good prognosis in primary breast cancer. *Cancer Res.* 1998; 15: 2166-2169.
41. Hezova R, Ehrmann J, Kolar Z.: WWOX, a new potential tumor suppressor gene. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007; 151: 11-15.
42. Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Christensen IJ, Gayther S, Jacobs IJ, Hogdall CK.: Expression level of Wilms tumor 1 (WT1) protein has limited prognostic value in epithelial ovarian cancer: from the Danish "MALOVA" ovarian cancer study. *Gynecol Oncol.* 2007; 106: 318-324.
43. Hogdall EV, Ryan A, Kjaer SK, Blaakaer J, Christensen L, Bock JE, Glud E, Jacobs IJ, Hogdall CK.: Loss of heterozygosity on the X chromosome is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma: from the Danish "MALOVA" Ovarian Carcinoma Study. *Cancer.* 2004; 1: 2387-2395.
44. Huusko P.: Predisposing genes in hereditary breast and ovarian cancer. Oulu University Library. *Acta. Univ.Oul.* 1999; D541.
45. Imyanitov EN, Birrell GW, Filippovich I: Frequent loss of heterozygosity at 1p36 in ovarian adenocarcinomas but the gene encoding p73 is unlikely to be the target. *Oncogene.* 1999; 18: 4640–4642.
46. Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, Yang-Feng TL, Gray JW.: Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res.* 1995; 15: 6172-6180.
47. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Monteiro J, Kern M, Criswell LA, Albani S, Nelson JL, Clegg DO, Pope R, Schroeder HW JR, Bridges SL JR, Pisetsky DS, Ward R, Kastner DL, Wilder RL, Pincus T, Callahan LF, Flemming D, Wener MH,

- Gregersen PK.: A genome wide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 927-936.
48. Jazaeri AA, Chandramouli GV, Aprelikova O, Nuber UA, Sotiriou C, Liu ET, Ropers HH, Yee CJ, Boyd J, Barrett JC.: BRCA1-mediated repression of select X chromosome genes. *J Transl Med.* 2004; 21: 32.
49. Kasprzak L, Mesurole B, Tremblay F, Galvez M, Halwani F, Foulkes WD.: Invasive breast cancer following bilateral subcutaneous mastectomy in a BRCA2 mutation carrier: a case report and review of the literature. *World J Surg Oncol.* 2005; 4: 52.
50. Katso RM, Manek S, O'Byrne K, Playford MP, Le Meuth V, Ganesan TS.: Molecular approaches to diagnosis and management of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1997; 16: 81–107.
51. Kim S, Rimm D, Carter D, Khan A, Parisot N, Franco MA, Bale A, Haffty BG.: BRCA status, molecular markers, and clinical variables in early, conservatively managed breast cancer. *Breast J.* 2003; 9: 167-174.
52. Kim TM, Benedict WF, Xu HJ.: Loss of heterozygosity on chromosome 13 is common only in the biologically more aggressive subtypes of ovarian epithelial tumors and is associated with normal retinoblastoma gene expression. *Cancer Res.* 1994; 54: 605–609.
53. Kim YT, Nam EJ, Yoon BS, Kim SW, Kim SH, Kim JH, Kim HK, Koo JS, Kim JW.: Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 in Korean sporadic ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005; 99: 585-590.
54. Koike M, Takeuchi S, Park S, Hatta Y, Yokota J, Tsuruoka N, Koeffler HP.: Ovarian cancer: loss of heterozygosity frequently occurs in the ATM gene, but structural alterations do not occur in this gene. *Oncology.* 1999; 56: 160-163.
55. Koreth J, O'Leary JJ, O'D McGee J.: Microsatellites and genomic analysis. *J Pathol.* 1996; 178: 239-248.
56. Kristensen GB, Kildal W, Abeler VM, Kaern J, Vergote I, Trope CG,

- Danielsen HE.: Large-scale genomic instability predicts longterm outcome for women with invasive stage I ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2003; 14: 1494-1500.
57. Kuprjańczyk J, Mądry R, Plisiecka-Hałas J, Bar J, Kraszewska E, Ziółkowska I, Timorek A, Stelmachów J, Emerich J, Płużańska A, Rzepka-Górska I, Urbański K, Zieliński J, Markowska J.: TP53 status determines clinical significance of ERBB2 expression in ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2004; 91: 1916-1923.
58. Kurman RJ, Shih IeM.: Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol.* 2008; 27: 151-160.
59. Kurose K, Zhou XP, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, Eng C.: Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol.* 2001; 158: 2097–2106.
60. Kwong J, Lee JY, Wong KK, Zhou X, Wong DT, Lo KW, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC.: Candidate tumor-suppressor gene DLEC1 is frequently downregulated by promoter hypermethylation and histone hypoacetylation in human epithelial ovarian cancer. *Neoplasia.* 2006; 8: 268-278.
61. Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan CM, Cochran C, Gumbs C, Seal S, Barfoot R, Collins N, Bignell G, Patel S, Hamoudi R, Larsson C, Wiseman RW, Berchuck A, Iglehart JD, Marks JR, Ashworth A, Stratton MR, Futreal PA.: BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nature Genet.* 1996; 13: 238-240.
62. Launonen V, Stenbäck F, Puistola U, Bloigu R, Huusko P, Kytölä S, Kauppila A, Winqvist R.: Chromosome 11q22.3-q25 LOH in ovarian cancer: association with a more aggressive disease course and involved subregions. *Gynecol Oncol.* 1998; 71: 299-304.
63. Lavin MF.: ATM: the product of the gene mutated in ataxiatelangiectasia. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31: 735–740.
64. Li J, Yen C, Liaw D.: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase

- gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997; 275: 1943–1947.
- 65.** Limon J.: Genetyczne podłoże chorób nowotworowych, (w:) Węgleński P. (red.), *Genetyka molekularna*, PWN, Warszawa 2006; 400-429.
- 66.** Lin H, Huber R, Schlessinger D, Morin PJ.: Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*. 1999; 15: 807-810.
- 67.** Liu Y, Ganesan TS.: Tumour suppressor genes in sporadic epithelial ovarian cancer. *Reproduction*. 2002; 123: 341-353.
- 68.** Lounis H, Mes-Masson AM, Dion F, Bradley WE, Seymour RJ, Provencher D, Tonin PN.: Mapping of chromosome 3p deletions in human epithelial ovarian tumors. *Oncogene*. 1998; 5: 2359-2365.
- 69.** Lu KH, Weitzel JN, Kodali S, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC.: A novel 4-cm minimally deleted region on chromosome 11p15.1 associated with high-grade nonmucinous epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res*. 1997; 57: 387–390.
- 70.** Mahata P.: Biomarkers for epithelial ovarian cancers. *Genome Inform*. 2006; 17: 184-193.
- 71.** Majdak EJ, De Bock GH, Brozek I, Perkowska M, Ochman K, Debniak J, Milczek T, Cornelisse CJ, Jassem J, Emerich J, Limon J, Devilee P.: Prevalence and clinical correlations of BRCA1/BRCA2 unclassified variant carriers among unselected primary ovarian cancer cases - preliminary report. *Eur J Cancer*. 2005; 41: 143-150.
- 72.** Manyś G.: Czynniki prognostyczne w raku jajnika. (w:) Markowska J. (red.), *Onkologia Ginekologiczna*, Wyd. Med. Urban&Partner, Wrocław 2002; 789-798.
- 73.** Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A.: DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nature Genet*. 1997; 17: 32- 39.
- 74.** Moller P, Hagen AI, Apold J, Maehle L, Clark N, Fiane B, Lovslett

- K, Hovig E, Vabo A.: Genetic epidemiology of BRCA mutations--family history detects less than 50% of the mutation carriers. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1713-1717.
- 75.** Morrison P, Hodgson SV, Haites NE.: Familial Breast and ovarian cancer. Cambridge University Press. 2002; 45-61.
- 76.** Naidoo R, Chetty R.: The application of microsatellites in molecular pathology. *Pathol Oncol Res*. 1998; 4: 310-315.
- 77.** Nakayama K, Takebayashi Y, Hata K, Fujiwaki R, Iida K, Fukumoto M, Miyazaki K.: Allelic loss at 19q12 and Xq11-12 predict an adverse clinical outcome in patients with mucinous ovarian tumours of low malignant potential. *Br J Cancer*. 2004; 22: 1204-1210.
- 78.** Nunez MI, Rosen DG, Ludes-Meyers JH, Abba MC, Kil H, Page R, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Liu J, Mills GB, Aldaz CM.: WWOX protein expression varies among ovarian carcinoma histotypes and correlates with less favorable outcome. *BMC Cancer*. 2005; 5: 64.
- 79.** Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, Campbell IG.: Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res*. 1998; 58: 2095–2097.
- 80.** Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Meijers-Heijboer H, van Asperen CJ, Hoogerbrugge N, van Leeuwen I, Vasen HF, Cleton-Jansen AM, Kraan J, Houwing-Duistermaat JJ, Morreau H, Cornelisse CJ, Devilee P.: Characterization of familial non-BRCA1/2 breast tumors by loss of heterozygosity and immunophenotyping. *Clin Cancer Res*. 2006; 15: 1693-700.
- 81.** O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, Deavers MT, Malpica A, McCluggage WG.: High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology*. 2007; 50: 773-779.
- 82.** Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C et al.: WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 11: 417–422.

83. Perkowska M, Brozek I, Wysocka B, Haraldsson K, Sandberg T, Johansson U, Sellberg G, Borg A, Limon J.: BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mutat.* 2003; 21: 553-554.
84. Phillips NJ, Ziegler MR, Radford DM, Fair KL, Steinbrueck T, Xynos FP, Donis-Keller H.: Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 606–611.
85. Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M.: Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: S52-S59.
86. Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A et al.: Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson–Golabi–Behmel overgrowth syndrome. *Nature Genet.* 1996; 12: 241–247.
87. Prat J, Ribe A, Gallardo A.: Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol.* 2005; 36: 861-870.
88. Presneau N, Dewar K, Forgetta V, Provencher D, Mes-Masson AM, Tonin PN.: Loss of heterozygosity and transcriptome analyses of a 1.2 Mb candidate ovarian cancer tumor suppressor locus region at 17q25.1-q25.2. *Mol Carcinog.* 2005; 43: 141-154.
89. Riman T, Persson I, Nilsson S.: Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. *Clin Endocrinol.* 1998; 49: 695-707.
90. Riman T, Nilsson S, Persson IR.: Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004; 83: 783-795.
91. Rimessi P, Gualandi F, Morelli C, TrabANELLI C, Wu Q, Possati L, Montesi M, Barrett JC, Barbanti-Brodano G.: Transfer of human chromosome 3 to an ovarian carcinoma cell line identifies three regions on 3p involved in ovarian cancer. *Oncogene* 1994; 9: 3467-3474.
92. Sarantaus L, Huusko P, Eerola H, Launonen V, Vehmanen P, Rapakko K, Gillanders E, Syrjakoski K, Kainu T, Vahteristo P,



- Krahe R, Paakkonen K, Hartikainen J, Blomqvist C, Lopponen T, Holli K, Ryyanen M, Butzow R, Borg A, Wasteson Arver B, Holmberg E, Mannermaa A, Kere J, Kallioniemi OP, Winqvist R, Nevanlinna H.: Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8: 757-763.
- 93.** Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM, Karp SE, Begg CB.: The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10: 467-473.
- 94.** Sato T, Saito H, Morita R, Koi S, Lee JH, Nakamura Y.: Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 5118–5122.
- 95.** Scully R, Livingston DM.: In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature.* 2000; 23: 429-432.
- 96.** Sekine M, Nagata H, Tsuji S, Hirai Y, Fujimoto S, Hatae M, Kobayashi I, Fujii T, Nagata I, Ushijima K, Obata K, Suzuki M, Yoshinaga M, Umesaki N, Satoh S, Enomoto T, Motoyama S, Tanaka K, Japanese Familial Ovarian Cancer Study Group.: Localization of a novel susceptibility gene for familial ovarian cancer to chromosome 3p22-p25. *Hum Mol Genet.* 2001; 15: 1421-1429.
- 97.** Sellar GC, Li L, Watt KP.: BARX2 induces cadherin 6 expression and is a functional suppressor of ovarian cancer progression. *Cancer Res.* 2001; 61: 6977–6981.
- 98.** Shelling AN, Cooke IE and Ganesan TS.: The genetic analysis of ovarian cancer. *Br. J. Cancer.* 1995; 71: 521–527.
- 99.** Shelling AN, Foulkes W.: Molecular genetics of ovarian cancer. *Mol Biotechnol.* 2001; 19: 13-28.
- 100.** Shih IeM, Kurman RJ.: Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004; 164: 1511-1518.
- 101.** Silver DP, Dimitrov SD, Feunteun J, Gelman R, Drapkin R, Lu SD, Shestakova E, Velmurugan S, Denunzio N, Dragomir S, Mar J, Liu X, Rottenberg S, Jonkers J, Ganesan S, Livingston DM.: Further

- evidence for BRCA1 communication with the inactive X chromosome. *Cell*. 2007; 9: 991-1002.
102. Stadlmann S, Gueth U, Baumhoer D, Moch H, Terracciano L, Singer G.: Glypican-3 expression in primary and recurrent ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2007; 26: 341-344.
  103. Stanisław A.: Przystępny kurs statystyki w oparciu o program Statistica PL na przykładach z medycyny, t.2. Statsoft, Kraków 2000.
  104. Stanisław A.: Przystępny kurs statystyki. StatSoft Polska Sp.z o.o. 1998.
  105. Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH.: The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)*. 2004; 3: 845-854.
  106. Stratton JF, Thompson D, Bobrow L, Dalal N, Gore M, Bishop DT, Scott I, Evans G, Daly P, Easton DF, Ponder BA.: The genetic epidemiology of early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study. *Am J Hum Genet*. 1999; 65: 1725-1732.
  107. Stronach EA, Sellar GC, Blenkiron C, Rabiasz GJ, Taylor KJ, Miller EP, Massie CE, Al-Nafussi A, Smyth JF, Porteous DJ, Gabra H.: Identification of clinically relevant genes on chromosome 11 in a functional model of ovarian cancer tumor suppression. *Cancer Res*. 2003; 15: 8648-8655.
  108. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA.: The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 1997; 15: 1401-1408.
  109. Syed V, Mukherjee K, Lyons-Weiler J, Lau KM, Mashima T, Tsuruo T, Ho SM.: Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling. *Oncogene*. 2005; 3: 1774-1787.

110. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP.: Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* 1996; 26: 2255-2261.
111. Tavassoli M, Steingrimsdottir H, Pierce E, Jiang X, Alagoz M, Farzaneh F, Campbell IG.: Loss of heterozygosity on chromosome 5q in ovarian cancer is frequently accompanied by TP53 mutation and identifies a tumour suppressor gene locus at 5q13.1–21. *Br J Cancer.* 1996; 74: 115–119.
112. Thompson FH, Liu Y, Emerson J, Weinstein R, Makar R, Trent JM, Taetle R, Alberts DS.: Simple numeric abnormalities as primary karyotype changes in ovarian carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994; 10: 262-266.
113. Tryggvadottir L, Sigvaldason H, Olafsdottir GH, Jonasson JG, Jonsson T, Tulinius H, Eyfjord JE.: Population-based study of changing breast cancer risk in Icelandic BRCA2 mutation carriers, 1920-2000. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 18: 116-122.
114. Uzawa N, Yoshida MA, Oshimura M, Ikeuchi T.: Suppression of tumorigenicity in three different cell lines of human oral squamous cell carcinoma by introduction of chromosome 3p via microcell-mediated chromosome transfer. *Oncogene.* 1995; 16: 1997-2004.
115. Van Poucke M, Sjoberg A, Mattheeuws M, Van Zeveren A, Bouquet Y, Chowdhary BP, Peelman LJ.: Mapping of the ATP2B2 and PCCB genes on porcine chromosome 13. *Mamm Genome.* 1997; 8: 852-853
116. Wang Q, Zhang H, Fishel R, Greene MI.: BRCA1 and cell signaling. *Oncogene.* 2000; 19: 6152 – 6158.
117. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J.: BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 2000; 15: 927-939.
118. Welch PL, Owens KN, King MC.: Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.* 2000; 16: 69-74.

119. Wertheim I, Tangir J, Muto MG, Welch WR, Berkowitz RS, Chen WY, Mok SC.: Loss of heterozygosity of chromosome 17 in human borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene*. 1996; 12: 2147–2153.
120. Wojciechowska U, Didkowska J, Tarkowski W, Zatoński W: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2002 roku. Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2004.
121. Xu XX, Yi T, Tang B and Lambeth JD.: Disabled-2 (Dab2) is an SH3 domain-binding partner of Grb2. *Oncogene*. 1998; 16: 1561–1569.
122. Yamamoto S, Tsuda H, Kita T, Maekawa K, Fujii K, Kudoh K, Furuya K, Tamai S, Inazawa J, Matsubara O.: Clinicopathological significance of WT1 expression in ovarian cancer: a possible accelerator of tumor progression in serous adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2007; 451: 27-35.
123. Yang-Feng TL, Han H, Chen KC, Li SB, Claus EB, Carcangiu ML, Chambers SK, Chambers JT, Schwartz PE.: Allelic loss in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 1993; 19: 546-551.
124. Yu Y, Xu F, Peng H et al.: NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 214–219.
125. Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD.: Tumor suppressors on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*. 2002; 21: 6915 – 6935.
126. Zborovskaya I, Gasparian A, Karseladze A, Elcheva I, Trofimova E, Driouch K, Trassard M, Tatosyan A, Lidereau R.: Somatic genetic alterations (LOH) in benign, borderline and invasive ovarian tumours: intratumoral molecular heterogeneity. *Int J Cancer*. 1999; 9: 822-826.
127. Zheng JP, Robinson WR, Ehlen T, Yu MC, Dubeau L.: Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res*. 1991; 1: 4045-4051.

- 128.** Zhou X, Rao NP, Cole SW, Mok SC, Chen Z, Wong DT.: Progress in concurrent analysis of loss of heterozygosity and comparative genomic hybridization utilizing high density single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 159: 53-57.