

Karolina Ochman

**UTRATA HETEROZYGOTYCZNOŚCI LOCI
SPRZĘŻONYCH Z GENAMI
BRCA1 i *BRCA2* W RAKACH JAJNIKA**
(rozprawa doktorska)

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki AMG
Kierownik i Promotor: Prof. dr hab. Janusz Limon

Gdańsk 2006

Praca została sfinansowana z grantu KBN 3 P05A 024 23

Pracę wykonano w ramach Studium Medycyny Molekularnej
w Warszawie

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	1
2. WSTĘP.....	3
2.1. Zachorowalność na raka jajnika.....	3
2.2. Epidemiologia raka jajnika.....	3
2.2.1. Wiek.....	3
2.2.2. Czynniki reprodukcyjne i hormonalne.....	3
2.2.3. Schorzenia ginekologiczne.....	4
2.2.4. Zakażenie wirusem epidemicznego zapalenia przyusznic.....	4
2.2.5. Czynniki środowiskowe i socjoekonomiczne, dieta.....	5
2.2.6. Ekspozycja na azbest i talk.....	5
2.3. Obraz kliniczny raka jajnika.....	5
2.4. Charakterystyka histopatologiczna nowotworów jajnika	7
2.5. Leczenie raka jajnika.....	8
2.6. Czynniki prognostyczne w raku jajnika.....	9
2.6.1. Stopień kliniczny wg FIGO.....	9
2.6.2. Stopień zróżnicowania histopatologicznego.....	9
2.6.3. Wiek.....	9
2.6.4. Operacje cytoredukcyjne.....	9
2.6.5. Obecność płynu w jamie otrzewnej.....	10
2.6.6. Ploidia DNA.....	10
2.6.7. CA 125 – marker nowotworowy	10
2.6.8. Wybrane zmiany na poziomie molekularnym.....	11
2.7. Molekularna patogeneza raka nabłonkowego jajnika.....	12
2.7.1. Utraty heterozygotyczności i niestabilność mikrosatelitarna.....	15
2.8. Geny zaangażowane w transformację nowotworową.....	17
2.9. Dziedziczne postacie raka jajnika.....	18

2.9.1. Geny BRCA1 i BRCA2 - lokalizacja cytogenetyczna, struktura oraz funkcje produktów białkowych.....	20
2.9.2. Metody badania genów.....	24
2.9.3. Częstości mutacji genów BRCA1 i 2 oraz ich spektrum mutacji	27
2.9.4. Nosiciele mutacji germinalnych genu BRCA1 i 2 a ryzyko rozwoju raka.....	30
2.10. Utraty heterozygotyczności (LOH) loci genów BRCA1 i BRCA2.....	33
3. CELE PRACY.....	37
4. MATERIAŁ.....	38
4.1 Dane kliniczne badanych pacjentów.....	39
5. METODY.....	43
5.1 Aparatura.....	43
5.2 Odczynniki.....	43
5.3 Roztwory.....	44
5.4 Izolacja materiału genetycznego.....	45
5.4.1 Izolacja z pełnej krwi obwodowej.....	45
5.4.2 Izolacja ze świeżo mrożonych fragmentów guzów nowotworowych.....	46
5.4.3 Izolacja z fragmentów tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie.....	46
5.5 Technika LOH.....	47
5.5.1 Polimorficzne markery z chromosomu 17.....	47
5.5.2 Polimorficzne markery z chromosomu 13.....	50
5.5.3 Polimorficzne markery z chromosomów 15 i 16.....	52
5.5.4 Amplifikacja markerów techniką PCR.....	54
Tabela 9. Warunki amplifikacji markerów LOH.....	54
5.5.5 Analiza amplifikowanych fragmentów.....	55
5.5.6 Ocena utraty heterozygotyczności (LOH).....	55

5.6 Badanie mutacji.....	58
5.6.1 Najczęstsze mutacje w genie BRCA1.....	58
5.6.2 Analiza molekularna eksonu 11 genu BRCA1 w 20 wybranych przypadkach.....	63
5.6.3 Analiza eksonów 10 i 11 genu BRCA2.....	64
5.6.4 Sekwencjonowanie wybranych produktów PCR.....	66
5.7 Analiza statystyczna wyników.....	67
6. WYNIKI.....	68
6.1 Analiza utraty heterozygotyczności (LOH).....	68
6.2 Analiza wyników badania mutacji genów BRCA1 i BRCA2.....	73
6.3 Korelacje między wynikami badań molekularnych a danymi klinicznymi	78
7. DYSKUSJA.....	82
8. WNIOSKI.....	101
9. STRESZCZENIE.....	103
10. PIŚMIENNICTWO.....	106

1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BIC	<i>Breast Cancer Information Core</i>
BMI	wskaźnik masy ciała (<i>body mass index</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	kwask deoksyrybonukleinowy
EDTA	kwask etylenodwuaminoczterooctowy
F	starter sensowny
F	mutacja przesunięcia ramki odczytu (<i>frameshift</i>)
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>)
GDB	<i>Genome Database</i>
HA	analiza heterodupleksów (<i>heteroduplex analysis</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>)
K	DNA pochodzące z tkanki prawidłowej - krwi
kb	tysiąc par zasad (<i>kilo base</i>)
kD	tysiąc atomowych jednostek masy (<i>kilo Dalton</i>)
LOH	utrata heterozygotyczności (<i>loss of heterozygosity</i>)
M	mutacje zmiany sensu (<i>missense</i>)
MI	niestabilność mikrosatelitarna (<i>microsatellite instability</i>)
N	mutacja braku sensu (<i>nonsense</i>)
NHEJ	<i>nonhomologous end-joining</i>
NI	przypadek nieinformacyjny (<i>noninformative case</i>)
OCCR	<i>ovarian cancer cluster region</i>
OSE	pierwotny nabłonek powierzchniowy jajnika (<i>ovarian surface epithelium</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
PTT	test przedwczesnej terminacji translacji (<i>protein truncation test</i>)
R	starter antysensowny
r.ż.	rok życia
RFLP	polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (<i>restriction</i>

	<i>fragments length polymorphism</i>
S	mutacja składania (<i>splicing</i>)
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SSA	<i>single-strand annealing</i>
SSCP	analiza konformacji pojedynczych nici DNA (<i>single strand conformation polymorphism</i>)
SSHOC	dziedziczny izolowany rak jajnika (<i>site-specific hereditary ovarian cancer</i>)
STR	proste powtórzenie tandemowe (<i>simple tandem repeat</i>)
STS	miejsce znaczone sekwencyjnie (<i>sequence tagged site</i>)
T	DNA wyizolowane z tkanki guza
TSG	gen supresorowy (<i>tumor suppressor gene</i>)
USG	badanie ultrasonograficzne
UTR	regiony nie ulegające translacji (<i>untranslated regions</i>)
UV	nieznany wariant (<i>unclassified variant</i>)
VNTR	zmienna liczba powtórzeń tandemowych (<i>variable number of tandem repeats</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organization</i>)

2. WSTĘP

2.1. Zachorowalność na raka jajnika

Polska należy do krajów o wysokiej zachorowalności na raka jajnika. W roku 2002 rak jajnika był szóstym co do częstości występowania nowotworem u kobiet i czwartą co do częstości przyczyną zgonów nowotworowych w Polsce. Standaryzowany współczynnik zachorowalności w 2002 roku wynosił 11,3 i wzrósł znacznie w porównaniu z rokiem 1963 (5,9). W województwie pomorskim rak jajnika zajmuje czwartą pozycję (6,9) w strukturze zachorowalności na nowotwory złośliwe, wyprzedzając raka szyjki macicy (6,0) i raka trzonu macicy (5,9) [195].

Według danych statystycznych z ostatnich lat zachorowalność na raka jajnika na świecie wykazuje stały wzrost. Obserwuje się bardzo zróżnicowaną zachorowalność dotyczącą różnych kontynentów, regionów geograficznych, ras i grup etnicznych. Nowotwory te najczęściej dotyczą kobiet po okresie menopauzy i przeważnie (70%) rozpoznawane są w późnych stadiach zaawansowania [72, 160].

Mimo udoskonalenia technik operacyjnych i wprowadzania nowych sposobów chemioterapii, odsetek pięcioletnich przeżyć u chorych na raka jajnika zasadniczo nie zmienił się i wynosi obecnie około 30-40% [174].

2.2. Epidemiologia raka jajnika

W analizie epidemiologicznej wyodrębnia się szereg czynników mających związek z zapadalnością na raka jajnika:

2.2.1. Wiek

Rak jajnika rozwija się najczęściej u kobiet w okresie pomenopauzalnym, osiągając szczyt około 60 roku życia. Przeżycie pięcioletnie jest także zależne od wieku pacjentki <45 lat – wynosi 70%, a >75 lat – 20% chorych [174, 72]. W Polsce, w 2002 roku, wzrost zachorowalności na raka jajnika następuje od wieku 40-44 lat (15,2) i osiąga szczyt w grupie wiekowej 75-79 lat (42,2) [195].

2.2.2. Czynniki reprodukcyjne i hormonalne

Zahamowanie owulacji poprzez ciążę, laktację oraz antykoncepcję hormonalną wydaje się być czynnikiem chroniącym przed wystąpieniem raka

jajnika [142, 194, 154]. Przyjmowanie doustnych środków antykoncepcyjnych obniża ryzyko zachorowania na raka jajnika od 30 do 50% [103]. W ocenie ryzyka zmian hormonalnych w organizmach kobiet podkreśla się protekcyjne działanie podwyższonych poziomów progesteronu, w przeciwieństwie do negatywnego działania androgenów [151]. Ryzyko zachorowania na raka jajnika jest nieznacznie zwiększone u kobiet, u których wcześniej wystąpiła *menarche*, późno weszły w wiek przekwitania, a więc długo pozostawały w okresie pełnej sprawności czynnościowej jajników [142]. Proces owulacji uszkadza nabłonek jajnika, co pobudza proliferację otaczających komórek nabłonkowych i tworzenie się cyst inkluzyjnych, w których może zostać zainicjowany proces nowotworzenia [41]. Zachorowalność na raka jajnika jest również częstsza wśród kobiet leczących się z powodu niepłodności [156].

2.2.3. Schorzenia ginekologiczne

Gruczolistość (*endometriosis*) jest chorobą polegającą na ektopowym występowaniu błony śluzowej macicy [175]. Wyniki wielu badań wykazały, że w ogniskach gruczolistości może dochodzić do procesu złośliwego. Prawdopodobnie w 5-10% przypadków gruczolistości jajnika zachodzi proces transformacji nowotworowej. Na podłożu ognisk gruczolistości jajnika mogą w szczególności powstawać raki endometrioidalne i jasnokomórkowe [123]. Inne schorzenia, jak zespół policystycznych jajników mogą mieć także związek z podwyższonym ryzykiem rozwoju raka jajnika [164]. Z kolei *histerektomia* oraz podwiązanie jajowodów są zabiegami chroniącymi przed zachorowaniem na raka jajnika, co między innymi jest tłumaczone przez przerwanie drogi transportu wstecznego potencjalnych kancerogenów [194, 84].

2.2.4. Zakażenie wirusem epidemicznego zapalenia przyusznic

Niektórzy autorzy wysunęli hipotezę, że część przebiegających subklinicznie infekcji wirusem epidemicznego zapalenia przyusznic może działać niszcząco na pęcherzyki jajnikowe oraz nabłonek powierzchniowy jajnika, co sprzyja w późniejszym wieku procesowi nowotworowemu w tym narządzie [114, 24].

2.2.5. Czynniki środowiskowe i socjoekonomiczne, dieta

Rak jajnika jest chorobą cywilizacyjną i częściej chorują na niego wykształcone kobiety mające dobre warunki życia. Rak dotyczy częściej również kobiet żyjących samotnie [150]. Wzrost ryzyka raka jajnika dla dolnego i górnego przedziału BMI wynosi ok. 30% [142].

Dieta uboga w zielone warzywa liściaste oraz spożywanie tłuszczów zwierzęcych mięsa, produktów mlecznych (picie mleka pełnotłustego) i produktów bogatych w laktozę ma mieć promujący wpływ na wystąpienie raka jajnika [92].

2.2.6. Ekspozycja na azbest i talk

Kobiety mające kontakt z azbestem zapadają na szereg nowotworów narządów jamy brzusznej, również raka jajnika. Strukturę chemiczną zbliżoną do azbestu ma talk kosmetyczny, którego stosowanie na okolicę krocza w części prac było oceniane jako związane ze wzrostem ryzyka raka jajnika [124, 95], w innych zaś zostało ocenione jako nieistotne [76].

2.3. Obraz kliniczny raka jajnika

Stopień zaawansowania jest najważniejszym czynnikiem rokowniczym. W celu oceny klinicznego stopnia zaawansowania nowotworów złośliwych jajnika Międzynarodowe Stowarzyszenie Ginekologii i Położnictwa (FIGO) opracowało odpowiednią klasyfikację tych nowotworów [184]:

Stopień I: guz ograniczony do jajników

- I A jeden jajnik, bez wysięku otrzewnowego, torebka nieuszkodzona
- I B oba jajniki, bez wysięku otrzewnowego, torebka nieuszkodzona
- I C guz jak w IA lub IB, zajęcie torebki, jej uszkodzenie lub wodobrzusze z obecnością kom. nowotworowych w wysięku.

Stopień II: guz jednego lub obu jajników; zajęcie narządów miednicy mniejszej

- II A nacieczenie lub przerzuty do macicy lub jajowodów
- II B naciekanie innych narządów miednicy mniejszej
- II C guz jak w IIA lub IIB, torebki, jej uszkodzenie lub wodobrzusze z obecnością kom. nowotworowych w wysięku.

Stopień III: guz jednego lub obu jajników z przerzutami poza miednicą mniejszą/lub przerzutami do węzłów pozaotrzewnowych lub pachwinowych

- III A guz makroskopowo ograniczony do miednicy mniejszej, mikroskopowo rozsiew poza miednicę mniejszą
- III B guz jednego lub obu jajników, z naciekami śródtrzewnowymi $\leq 2\text{cm}$
- III C nacieki śródtrzewnowe $> 2\text{cm}$ i/lub zajęte węzły pozaotrzewnowe lub pachwinowe

Stopień IV: zajęcie narządów odległych, włączając wątrobę oraz opłucną

Objawy kliniczne w raku jajnika, szczególnie w I i II stopniu zaawansowania wg FIGO nie są swoiste i wczesna wykrywalność stanowi poważny problem kliniczny. Dopiero w momencie gdy guz zaczyna rozprzestrzeniać się poza miednicę mniejszą, pojawiają się dyskretne objawy dyskomfortu w jamie brzusznej: uczucie ucisku, wzdęcia, bóle o nietypowej lokalizacji, nagłe parcie na mocz, zaparcia i okresowo bolesne stosunki płciowe oraz objawy dysgastryczne. Powiększenie się obwodu brzucha i uczucie pełności są wynikiem pojawienia się płynu w jamie otrzewnej (30% chorych). W późniejszym okresie rozwoju raka pojawiają się objawy typowe dla zaawansowanej choroby nowotworowej, do wyniszczenia nowotworowego włącznie [144, 53, 128].

2.4. Charakterystyka histopatologiczna nowotworów jajnika

Guzy jajnika cechują się dużą różnorodnością cech morfologicznych i biologicznych. Rozróżnia się guzy łagodne, złośliwe i postacie przejściowe lub graniczne (*borderline cases*) [17].

Klasyfikacja histopatologiczna guzów jajnika wg WHO [184]:

- I. Nowotwory nabłonkowe:
 - a. Guzy surowicze
 - b. Guzy śluzowe
 - c. Guzy endometroidalne
 - d. Guzy jasnokomórkowe (mezonefroidalne)
 - e. Guzy Brennera
 - f. Guzy płaskonabłonkowe
 - g. Guzy nabłonkowe mieszane
 - h. Raki niezróżnicowane
 - i. Guzy niesklasyfikowane
- II. Nowotwory ze sznurów płciowych i zrębu jajnika
 - a. Ziarniszczyk, otoczkowiak
 - b. Jądrzak
 - c. Gynandroblastoma
 - d. Guzy niesklasyfikowane
- III. Nowotwory z komórek lipidowych
- IV. Nowotwory z pierwotnej komórki rozrodczej
 - a. Rozrodczak
 - b. Guz pęcherzyka żółtkowego
 - c. Rak zarodkowy
 - d. Poliembrioma
 - e. Nabłoniak kosmówkowy
 - f. Potworniaki
 - g. Guzy mieszane
- V. Gonadoblastoma
- VI. Guzy sieci jajnika
- VII. Guzy pochodzenia mezotelialnego
- VIII. Guzy niepewnego pochodzenia
- IX. Ciążowa choroba trofoblastyczna
- X. Guzy tkanek miękkich niespecyficzne dla jajnika
- XI. Chłoniaki
- XII. Guzy niesklasyfikowane
- XIII. Guzy przerzutowe

Nowotwory wywodzące się z nabłonka pokrywającego jajnik i z podścieliska są najliczniejszą grupą pierwotnych nowotworów jajnika. Stanowią one około 60% wszystkich nowotworów jajnika i około 80-90% guzów złośliwych jajnika. Ze względu na częstość występowania największe znaczenie praktyczne mają nowotwory nabłonkowe surowicze, śluzowe i endometrioidalne. Pozostałe rodzaje guzów występują sporadycznie.

Guzy nowotworowe surowicze stanowią około 40-50% nowotworów złośliwych jajnika. Są to nowotwory zbudowane przede wszystkim z komórek przekształconego nabłonka powierzchniowego jajnika. Komórki wypełniają różnej wielkości torbielowate przestrzenie, które wyściełają lub wypełniają lite lub brodawkowate struktury. Guzy śluzowe odróżnia od ostatnich obecność śluzu w cytoplazmie, co jest uwidaczniane dzięki odpowiednim barwieniom. Są one rzadsze od surowicznych i trudne do odróżnienia od przerzutów raka jelita grubego. 10-20% przypadków guzów endometrioidalnych może współistnieć z endometriozą jajników. Budowa tego podtypu histopatologicznego jest analogiczna do raka endometrioidalnego błony śluzowej trzonu macicy [17, 98].

Istotna jest ocena stopnia złośliwości histologicznej nowotworu na podstawie zróżnicowania struktury oraz cech cytologicznych komórek nowotworowych. Szczególnie obraz jądra komórkowego (wielkość jądra, barwność, figury podziałowe) jest decydujący w określeniu stopnia atypii komórkowej [17] (tab. 1).

Tabela 1. Stopień złośliwości histologicznej (*grading*) w raku jajnika [168].

Stopień złośliwości histologicznej	Zróżnicowanie guzów	Cechy atypii
G1	wysokie	Nieznaczne
G2	średnie	Średnie
G3	niskie	Znaczne

W oparciu o ustalony stopień zaawansowania klinicznego i stopień dojrzałości wybierany jest optymalny sposób leczenia operacyjnego i chemioterapii w celu uzyskania jak największej cytoredukcji guza [73, 126].

2.5. Leczenie raka jajnika

Strategia leczenia raka jajnika zależy od stopnia zaawansowania klinicznego i stopnia dojrzałości histologicznej nowotworu. Proces leczenia rozpoczyna się zawsze od wykonania zabiegu operacyjnego w celu ustalenia charakterystyki guza i przeprowadzenia jego maksymalnej cytoredukcji. U pacjentek ze stopniem zaawansowania klinicznego 1A lub 1B i wysokim lub średnim stopniem dojrzałości histologicznej nie stosuje się leczenia uzupełniającego. W pozostałych przypadkach chore są poddawane wielolekowej chemioterapii standardowo opartej na kombinacji analogu

platyny z paklitakselem. Dalsze leczenie nastawione jest na jak największą cytoredukcję guza i powtórne leczenie operacyjne (*second-look laparotomy*) z uzupełniającym leczeniem chemioterapią dożylną lub chemioterapią dootrzewnową [178, 39, 126, 174].

2.6. Czynniki prognostyczne w raku jajnika

2.6.1. Stopień kliniczny wg FIGO

Stopień kliniczny wg FIGO jest podstawowym czynnikiem prognostycznym w raku jajnika. Określany jest na podstawie badań klinicznych, rozpoznania postawionego podczas zabiegu operacyjnego, ostatecznego rozpoznania histopatologicznego oraz cytologii z płynu otrzewnowego. Zaleca się pobranie wycinków ze wszystkich dróg potencjalnego rozsiewu nowotworowego, takich jak: otrzewna, wątroba, przepona oraz węzły chłonne miednicy mniejszej i przyaortalne.

Im wyższy stopień zaawansowania klinicznego choroby, tym krótszy jest czas przeżycia chorych. Średnie pięcioletnie przeżycie w raku jajnika wynosi 41%. W poszczególnych stopniach pięcioletnie przeżycie przedstawiało się następująco: 74% w I stopniu, 58% w II stopniu, 30% w stopniu III i 19% w stopniu IV [5].

2.6.2. Stopień zróżnicowania histopatologicznego

Stopień zróżnicowania histopatologicznego jest niezależnym czynnikiem prognostycznym i szczególnie zmienia rokowanie pacjentów z FIGO I [188]. Czas przeżycia chorych z wysoko zróżnicowanym rakiem jajnika jest znamienne dłuższy niż chorych z typem nisko zróżnicowanym. Jest to korelacja niezależna od postaci histologicznej raka [168].

2.6.3. Wiek

Jest to czynnik odgrywający ważną rolę w prognozie przebiegu choroby we wszystkich postaciach raka. Na podstawie wyników szerokiej analizy wielu autorów podaje, że zaawansowany wiek chorych (w większości jako granicę podaje się 65 lat) związany jest z gorszym rokowaniem [109].

2.6.4. Operacje cytoredukcyjne

Operacje cytoredukcyjne są niezależnym czynnikiem rokowniczym. Kompletna cytoredukcja znacznie wydłuża całkowity czas przeżycia i czas

wolny od postępu choroby [37]. Niezależny prognostyczny wpływ na wyniki leczenia i czas przeżycia chorej ma także lokalizacja i wielkość pozostawionej minimalnej choroby resztkowej oraz doświadczenie operatora [11, 119].

2.6.5. Obecność płynu w jamie otrzewnej

Obecność płynu w otrzewnej charakteryzuje się złym rokowaniem co do czasu przeżycia. U 130 chorych z III i IV stopniem zaawansowania raka jajnika, w grupie z wysiękiem, pięcioletnie przeżycia wynosiły 5% w porównaniu z grupą bez wysięku 45% [147]. Pęknięcie torbieli nowotworowej oraz stwierdzenie komórek nowotworowych w cytologii otrzewnowej skraca czas przeżycia, zmieniając stopień zaawansowania wg FIGO z Ia/Ib na Ic.

2.6.6. Ploidia DNA

Ploidia DNA komórek nowotworowych jest niezależnym czynnikiem rokowniczym przeżycia w raku jajnika [83]. Guzy z diploidalną zawartością DNA korelują z dłuższym czasem przeżycia chorych [170]. Pacjentki z rakiem jajnika niejasnokomórkowym, o niskim zaawansowaniu FIGO I-II, wysokim zróżnicowaniu G I-II i z diploidalną lub wyższą zawartością DNA w guzie mają niskie ryzyko nawrotu choroby i mogą zostać wyłączone z uzupełniającej chemioterapii [86].

2.6.7. CA 125 – marker nowotworowy

Antygen CA 125 jest to mucynopodobna glikoproteina, której biologiczna funkcja nie została dotąd poznana. W raku jajnika podwyższone stężenie CA 125 (powyżej 35 U/ml) jest związane głównie z występowaniem nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego. Wykazuje on wysoką czułość (78-85,5%) i swoistość (78,3-93%), co wskazuje na jego dużą przydatność w monitorowaniu rozwoju i leczenia raka nieśluzowego jajnika [111]. Poziom CA 125 może być również podwyższony w szeregu innych zarówno fizjologicznych jak i chorobowych stanów, które mogą dotyczyć schorzeń ginekologicznych i być zmianami zarówno łagodnymi jak i też złośliwymi [159]. Stężenie CA 125 w surowicy krwi chorych koreluje z masą guza, a więc odzwierciedla poziom optymalnej cytoredukcji guza i utrzymywanie się jego wysokiego poziomu w surowicy jest wskazaniem do

kontynuacji chemioterapii. Oznaczenie CA 125 jest niezwykle ważne we wczesnym wykrywaniu wznowy, gdzie w 70% przypadków jest jej pierwszym wskaźnikiem [111].

2.6.8. Wybrane zmiany na poziomie molekularnym

Poniżej wymieniono najczęstsze zmiany molekularne analizowane jako czynniki prognostyczne, których wartość rokownicza bądź jest już potwierdzona bądź wymaga dalszych badań.

- Wzmożona ekspresja zmutowanego białka TP53 w komórkach nowotworowych jest opisywana jako niekorzystny prognostycznie czynnik dla przeżycia chorych z rakiem jajnika. Doniesienia poruszające ten temat pozostają kontrowersyjne [31]. Wyróżnia się dwie główne grupy chorych różniące się rokowaniem: (1) stanowią mniej złośliwą grupę raków śluzowych i endometroidalnych z rzadkimi zmianami dotyczącymi immunohistochemicznej ekspresji białka TP53 i głównie diploidalną zawartością DNA oraz (2) bardziej złośliwą grupą raków surowicznych i anaplastycznych z częstymi zmianami ekspresji białka TP53 i niediploidalną zawartością DNA [170]. Istotne wydaje się również określenie przedoperacyjnego poziomu ekspresji TP53 w guzie chorej, ponieważ przeprowadzenie maksymalnej cytoredukcji w grupie TP53-negatywnych pacjentek podwyższa prawdopodobieństwo całkowitej remisji oraz obniża w sposób istotny ryzyko śmierci [89].
- Istotne dla oceny rokowania są wyniki badań nad modyfikatorami cyklu komórkowego współdziałającymi z białkiem TP53. Ekspresja białka p21 w guzach TP53-negatywnych jest niezależnym czynnikiem prognostycznym dłuższego czasu przeżycia [153]. Dysregulacja działania genów i ich produktów białkowych zawiadujących cyklem komórkowym jest obserwowana w rakach surowicznych jajnika i zmieniona ekspresja takich białek jak mdm2, cyklina D1, cyklina E, p27^{Kip1} i p21^{WAF1/CIP1} ma wpływ na przebieg kliniczny u chorych z rakiem jajnika [31, 6].
- Nadekspresja onkogenu ERBB2 (HER-2) jest niezależnym czynnikiem rokowniczym, związanym ze skróceniem zarówno całkowitego czasu przeżycia jak i też czasu przeżycia bez objawów choroby [19]. Ważna

wydaje się być zależność rokownicza ekspresji ERBB2 od akumulacji białka p53, co stwarza możliwość wyodrębnienia grupy chorych z rakiem jajnika do terapii dodatkowej anty-ERBB2 trastuzumabem [87].

- Komórki nabłonkowe raka jajnika wydzielają cytokiny takie jak TNF- α , interleukina 1 (IL-1), IL-6 i IL-12 oraz czynnik stymulujący kolonię makrofagów (CSF-1), które są znajdowane w wysięku otrzewnowym i mogą być związane z progresją guza [4]. Zgodnie z panującym poglądem wskazującym, że reakcja zapalna jest czynnikiem promującym rozwój guza nowotworowego jajnika, podwyższony poziom tych substancji bioaktywnych w surowicy, może mieć związek z niekorzystnym przebiegiem klinicznym [123, 124].
- Badanie ekspresji β -kateniny może okazać się cennym markerem prognostycznym dla raków nabłonkowych jajnika. Brak ekspresji tego białka oraz obecność choroby resztkowej mogą umożliwić wyodrębnienie grupy o gorszym rokowaniu w przebiegu choroby spośród pacjentów z FIGO I [40].
- Ponadto badane są też inne produkty białkowe protoonkogenów lub czynniki wzrostu, które mogą okazać się czynnikami prognostycznymi w raku jajnika, np.: K-ras [70], lub EGFR [125]. Oceniane są białka o prawdopodobnej roli w wytworzeniu oporności na chemioterapię, jak np.: HSP27 [51].

2.7. Molekularna patogeneza raka nabłonkowego jajnika

Histopatologicznie rak jajnika wywodzi się z nabłonka powierzchniowego jajnika i jego cyst inkluzyjnych. Rzadziej opisuje się rozwój na podłożu zmiany łagodnej np.: gruczolaków lub ognisk endometriozy [88]. Dla raka jelita grubego opracowano model molekularnej inicjacji i progresji guza, gdzie poszczególne zmiany na poziomie molekularnym odpowiadają zmianom morfologicznym [42]. W przypadku raka jajnika nie udało się opracować takiego modelu, ponieważ nie zostały tutaj sprecyzowane molekularne zmiany prekursorowe. Jeśli chodzi o zmiany molekularne, rak jajnika jest chorobą bardzo złożoną i heterogenną. A więc nawet guzy o tych samych cechach histologicznych u dwojga różnych

pacjentów mogą prezentować różny wzór aktywacji onkogenów lub utraty funkcji genów supresorowych [7].

W przypadku raków surowicznych, obserwacje histopatologiczne i badania molekularne sugerują rozrost nowotworowy z komórek nabłonka jajnika. Jest to grupa raków oceniana jako jednorodna pod względem patologicznym, gdzie różnice w ocenie stopnia złośliwości histologicznej odzwierciedlają progresję nowotworu. Już we wczesnych postaciach klinicznych występuje niski stopień zróżnicowania (G3) i morfologicznie przypominają zaawansowany nowotwór. Podobnie dzieje się na poziomie molekularnym: już bardzo małe ogniska gruczolakoraka surowiczego wraz z przylegającym zmienionym nabłonkiem prezentują obecność mutacji genu *TP53* (17p13.1). W zaawansowanych rakach surowicznych wykrywa się od 60% do 80% guzów z mutacjami *TP53*, natomiast bardzo rzadko znajdują się w tych guzach mutacje genu *KRAS* (12p12.1). Mutacje genu *KRAS* i jego mediatora *BRAF* są wykrywane tylko w rakach surowicznych o niskim stopniu zaawansowania histologicznego. Odwrotnie, guzy surowicze o granicznej złośliwości często prezentują mutacje genu *KRAS*, natomiast bardzo rzadko genu *TP53* [98]. Stąd też sformułowana została teoria, że dla typu surowiczego raka jajnika istnieje więcej niż jedna droga nowotworzenia [129, 90].

Raki śluzowe w znacznej części rozwijają się na podłożu guza łagodnego i w tych nowotworach częstą zmianą są mutacje *KRAS*, a rzadką *TP53*. Wzrastająca częstość mutacji kodonu 12/13 *KRAS* począwszy od guzów łagodnych przez graniczne do raków potwierdza hipotezę, że są to wczesne zmiany na torze mutacyjnym raków śluzowych [88].

Najczęstszą zmianą w sporadycznych rakach endometrioidalnych są mutacje genów β -kateniny (*CTNNB1*) (3p21) i *PTEN* (10q23). Mutacje genu *CTNNB1* występują w 38 do 50% raków endometrioidalnych. Dotyczą one eksonu 3 (kodony 32, 33, 37 i 41) i obejmują sekwencję fosforylacji dla syntazy kinazy glikogenu 3 β . Mutacje dotyczące tego fragmentu sekwencji powodują brak interakcji między GSK-3 β i APC, i w efekcie akumulację β -kateniny w jądrze komórkowym, co uruchamia transkrypcję szeregu genów zaangażowanych w nowotworzenie. Raki endometrioidalne

z immunohistochemicznie wykrywaną wewnątrzjądrowo β -kateniną są guzami o wczesnym stopniu zaawansowania i mają dobre rokowanie.

Mutacje genu *PTEN* (ekson 3-8) stwierdza się w 21% raków endometrioidalnych a utraty heterozygotyczności (LOH) w chromosomie 10q23, gdzie zlokalizowany jest ten gen, w 43% guzów. Większość raków endometrioidalnych z obecnością mutacji *PTEN* jest dobrze zróżnicowana i w stopniu zaawansowania klinicznego I, co sugeruje, że są to wczesne zmiany nowotworowe. Inaktywacja poprzez mechanizm hipermetylacji promotora została również opisana w genie *BRCA1* w 13% przypadków sporadycznych raków jajnika. Gen *CDKN2A*, czyli *p16* (9p21), kodujący białko regulujące fazę G1 cyklu komórkowego, także ulega inaktywacji w 33% guzów granicznych i 5% raków o rzadszym typie histopatologicznym poprzez mechanizm hipermetylacji promotora [98, 88].

Podczas onkogenezy raka jajnika morfologicznie pierwotny nabłonek powierzchniowy jajnika (OSE) ulega transformacji do histologicznie wysoce złożonej struktury przypominającej nabłonek przewodów Müllera [4]. Jest to sprzeczne z obserwacjami w rakach nabłonkowych innych narządów, gdzie transformacja nowotworowa powoduje powstanie komórek niskozróżnicowanych w porównaniu z wyjściowymi komórkami. Ten kierunek różnicowania w OSE być może jest związany z ekspresją E-kadheryny, cząsteczki związanej z adhezją komórek; markerem indukującym różnicowanie się nabłonka, którego normalnie nie ma w OSE. Jest to zmiana obserwowana we wczesnych etapach rozwoju *adenocarcinoma* [25].

Nowoczesna technika badania mikromacierzy DNA (*cDNA microarrays*) lub SAGE (*serial analysis of gene expression*) pozwala na jednoczesną ocenę profili ekspresji od kilku do kilkudziesięciu tysięcy genów, co umożliwi wyodrębnienie podtypów molekularnych guzów jajnika, a następnie dalsze badania, zmierzające do określenia, które z genów o zmienionej ekspresji mogą być przyczyną transformacji nowotworowej [97, 75]. Jest to również szukanie różnic w profilu molekularnym guza, który pozwoli na wytypowanie wczesnych zmian i nowych celów ukierunkowanej chemioterapii [171].

Złożone kariotypy opisywane w rakach jajnika są bardzo trudne do analizy i interpretacji ze względu na zaawansowanie usuwanych operacyjnie

guzów nowotworowych [134]. Pojawiła się wielka różnorodność technik biologii molekularnej, które mogą służyć do analizy tkanek raków jajnika. Analiza spektralna chromosomów (SKY), CGH (porównawcza hybrydyzacja genomowa) i LOH (utrata heterozygotyczności) pozwalają na ocenę utrat, nadatków oraz przemieszczeń materiału genetycznego w genomie guza. [24] Dzięki wynikom tych badań wykrywane są kolejne geny, jak np.: geny *OVCA1* i *OVCA2*, kandydujące na geny supresorowe [166] lub gen *DOC2/Dab2* [101].

2.7.1. Utraty heterozygotyczności i niestabilność mikrosatelitarna

Delecje fragmentów DNA, które obejmują okolicę genów zaangażowanych w transformację nowotworową można badać poprzez analizę utraty heterozygotyczności markerów mikrosatelitarnych – LOH. Technika ta zostanie szczegółowo omówiona w dalszej części wstępu.

W około 70 pracach opisujących utraty alleli w rakach sporadycznych jajnika badano tą techniką od jednego do kilkunastu regionów chromosomowych [101]. W rakach surowicznych zaobserwowano częste utraty heterozygotyczności wybranych regionów chromosomów 1, 6q, 11, 13q i 17 [88].

W przypadku ramion krótkich chromosomu 1 utraty często obserwuje się w regionie 1p36 (ok. 40%). W jego obrębie znaleziono gen *ARHI*, który jest genem podlegającym imprintingowi matczynemu i jest kandydatem na gen supresorowy. Utraty heterozygotyczności w próbkach guzów dotyczą preferencyjnie funkcjonalnego, nie podlegającego imprintingowi allela. Gen ten należy do rodziny onkogenów *ras* i jest negatywnym regulatorem wzrostu komórkowego poprzez hamowanie aktywności promotora cykliny D1 i indukcję p21^{WAF1/CIP1} [199].

Mimo niskiej częstości LOH chromosomu 5p (38%) [2], w prążku 5p13 znaleziono gen supresorowy *DOC2/Dab2*, który jest negatywnym regulatorem *Ras*-zależnego wzrostu komórkowego i jest często inaktywowany poprzez homologiczną delecję w guzach [101]. Badania immunohistochemiczne wykazały, że ekspresja *Dab2* jest wygaszana w 80% raków jajnika, co nie koreluje ze stopniem dojrzałości histologicznej guza (G). Uważa się, że inaktywacja *Dab2* jest wczesną zmianą w onkogenezie raka

jajnika, gdyż umożliwia niezależny od błony podstawnej i nieskoordynowany wzrost klonu komórkowego [25].

Liczne obserwacje utrat (46%) w obrębie ramion długich chromosomu 5 zainicjowały poszukiwania genu supresorowego. Ze względu na lokalizację znanego już genu *APC* w regionie 5q21-22 w guzach prezentujących LOH szukano mutacji tego genu. Brak obecności mutacji w genie *APC* oraz wysoka częstość LOH w próbkach raków jajnika posiadających mutację w genie *TP53* sugerują obecność innego genu kandydata o lokalizacji 5q13.1-21 [179].

Utraty heterozygotyczności w obrębie długich ramionach chromosomu 6 występują w różnych doniesieniach o raku jajnika z częstością średnio 48% [98]. W regionie częstych utrat: 6q24-25 zlokalizowano gen *LOT1*, którego produkt należy do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających motyw palca cynkowego i działa antyproliferacyjnie. Charakterystyczny jest brak ekspresji w komórkach raka jajnika i raka piersi tego normalnie występującego białka. Produkt genu jest wyciszany albo poprzez mechanizm LOH albo delecję homozygotyczną lub epigenetycznie przez hipermetylację promotora i deacetylację histonów [1]. Zlokalizowany w regionie 6q25.1 marker D6S1581 poprzez utraty został znamienne powiązany z opornością na leczenie chemiczne cis-platyną w grupie 22 raków nabłonkowych jajnika. Bliski do tej lokalizacji jest gen *IGF2R* i jeśli jego produkt białkowy zostanie utracony, zaburza równowagę pomiędzy IGF-2 i jego receptorem. Może to doprowadzić do promocji proliferacji i przeżywalności komórek, co tłumaczy ich oporność na chemioterapię [106].

Mutacje genu *PTEN* (w obrębie eksonów 3-8) stwierdza się w 20% raków endometrioidalnych, zaś utraty heterozygotyczności w obrębie prążka 10q23.3 w 43% tych raków i 27,3% raków jasnokomórkowych. [163] Utrata funkcji tylko jednego allela *PTEN* może wystarczyć do promocji wzrostu komórek [29]. W rakach piersi, hemizygotyczne delecje genu *PTEN*, były związane z utratą ekspresji białka. [136] Już cysty endometrioidalne wykazują LOH 10q23 i mutacje somatyczne genu *PTEN*, co świadczy, że są to wczesne zmiany na drodze kancerogenezy raka endometrioidalnego [163].

Ramiona q chromosomu 13 są często wymieniane jako tracone (do 50%) w raku sporadycznym jajnika, szczególnie w guzach o niskim stopniu

zróznicowania histologicznego [82]. Utraty w locus 13q14 genu *RB1* nie są powiązane z inaktywacją tego genu [101]. Delecje alleliczne chromosomów 13q i 17q dotyczące loci genów *BRCA1* i 2 omówiono w dalszej części wstępu.

Na chromosomie 17 opisuje się częste utraty zarówno ramion krótkich (53%) jak również długich (57%). W regionie 17p13.1 znajduje się gen supresorowy *TP53*, którego zmieniony produkt białkowy jest najczęściej spotykaną nieprawidłowością w ludzkich komórkach nowotworowych. W 17p13.3 obserwuje się aż 80% utrat w rakach jajnika o niskim stopniu zaawansowania. W tym regionie zidentyfikowano aż trzy nowe geny, będące „silnymi” kandydatami na geny supresorowe: *HIC-1*, *OVCA1* i *OVCA2* [101].

Częstą i charakterystyczną zmianą jest utrata heterozygotyczności w regionie nieaktywnego chromosomu Xq, którą obserwuje się niemal wybiórczo w surowiczych guzach granicznych jajnika [43]. LOH w regionie Xq11-12 oraz 19q12 w śluzowych guzach granicznych w sposób znamieny korelowała z krótszym czasem przeżycia, bez progresji choroby [120]. Również utraty markera DXS454 (Xq21-q23) wydają się korelować w pierwotnych rakach surowiczych jajnika z krótszym czasem przeżycia [69].

Badaniem, które również ma w swoim założeniu analizę typu *allelotyping* jest niestabilność mikrosatelitarna (MI), gdzie ocenia się fenotyp alleli pochodzących z DNA z tkanki nowotworowej. MI jest rzadko obserwowaną zmianą w rakach surowiczych jajnika. W przypadku guzów surowiczych o granicznej złośliwości, przejście od formy podstawowej do brodawkowatej, współistnieje z występowaniem niestabilności mikrosatelitarnej chromosomu 5q, a MI chromosomu 1p towarzyszy przejściu w formy inwazyjne raka [98]. MI występuje również w sporadycznych rakach endometroidalnych, aczkolwiek rzadziej niż w rakach endometrium macicy.

2.8. Geny zaangażowane w transformację nowotworową

Geny predyspozycji do zachorowania na nowotwór dzieli się na trzy podstawowe grupy: geny supresorowe, onkogeny i geny mutatorowe. Geny supresorowe i onkogeny uczestniczą w prawidłowych procesach kontroli rozwoju komórek i ich proliferacji, każde zaburzenie tych procesów stanowi składową procesu nowotworzenia. W przypadku genów supresorowych, są

one negatywnymi regulatorami podziałów komórkowych, gdzie klasycznym przykładem jest gen *TP53*. Utrata funkcji takiego genu powoduje ciągłe, niepostrzeżone podziały komórkowe w sytuacjach, takich jak np.: pęknięcia DNA powodujące uszkodzenia komórki, gdzie normalnie dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego. Dzięki badaniom Alfreda Knudsona nad zachorowaniami wśród dzieci na siatkówczaka złośliwego wiemy, że prawdopodobnym mechanizmem wyłączenia funkcji tych genów są tzw. dwa „uderzenia”. Według tej teorii, pierwsza zmiana genetyczna w obrębie jednego allela genu *RB1* jest już obecna u rodzica i może zostać odziedziczona jako cecha autosomalna dominująca. Jeśli dojdzie do kolejnego uszkodzenia w drugim allelu tego genu, nie powstaje produkt białkowy lub funkcja białka zostaje zniesiona i dochodzi do promocji rozwoju nowotworu. Teoria ta znajduje potwierdzenie zarówno w badaniach cytogenetycznych jak i molekularnych. Drugie „uderzenie” może być mutacją somatyczną, delecją materiału zawierającego drugi, prawidłowy allel, lub wynikiem wyciszenia genu poprzez mechanizmy epigenetyczne, np.: poprzez metylację. W przypadku guzów sporadycznych, następujące po sobie zmiany na obu allelach genu *RB1* zachodzą w na poziomie komórki somatycznej i stają się punktem wyjścia guza nowotworowego [176].

2.9. Dziedziczne postacie raka jajnika

Okolo 5-10% przypadków raka jajnika ma charakter dziedziczny. Już w latach 50-tych ubiegłego stulecia opisywano pierwsze rodziny z wyraźną transmisją rodzinną raka jajnika z pokolenia na pokolenie zgodnie z prawami Mendla. Rak jajnika jest jedną z charakterystycznych składowych fenotypu dwóch podstawowych zespołów dziedzicznie uwarunkowanych zachorowań na nowotwory: 1) dziedzicznego raka piersi/jajnika (*hereditary breast/ovarian cancer* – HBOC) stanowiącego 85-90% przypadków oraz 2) izolowanego raka jajnika (*site-specific hereditary ovarian cancer* – SSHOC) - okolo 10% przypadków. Poprzez analizę sprzężeń w rodzinach z kumulacją zachorowań na raka piersi lub raka jajnika, zostały zlokalizowane dwa geny podatności na raka piersi i jajnika: jako pierwszy *BRCA1* na chromosomie 17q12-21 [65], następnie *BRCA2* na 13q12-13, których mutacje dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący [196]. Mutacje germinalne genu *BRCA1* występują

częściej, u około 92% rodzin z HBOC, natomiast rzadziej występujące mutacje *BRCA2* są powiązane z zachorowaniami na raka piersi wśród mężczyzn [143]. 3) Trzecim zespołem, w którym często obserwowany jest rak jajnika, jest zespół Lynch II inaczej HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), gdzie w konstelacji innych nowotworów, rak jajnika występuje w mniej niż 10% przypadków. W zespole Lynch II występują mutacje genów mutatorowych, które są typowe dla dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego: *MSH2* (2p16), *MLH1* (3.p21.3-23), *MSH6* (2p16), *PMS2* (7p22) i *MLH3* (5q11-13) [27].

Analizując podłoże genetyczne zespołów HBOC i SSHOC, wydaje się, że stanowią one część spektrum jednej choroby, ponieważ nie został dotąd wykryty gen, który byłby związany jedynie ze zwiększoną skłonnością do zachorowania wyłącznie na raka jajnika. Kryterium ostatecznej diagnozy jest badanie na obecność nosicielstwa mutacji germlinalnej w genie *BRCA1* lub *BRCA2*. Bezobjawowi nosiciele są kwalifikowani do badań molekularnych na podstawie cech rodowodowych rodziny, tzn.: liczby zachorowań na raka piersi i/lub jajnika wśród krewnych pierwszego stopnia, wczesnego wieku zachorowania i charakteru nowotworu, np. czy wystąpił on jednocześnie w narządach parzystych.

W większości krajów wykonanie badania mutacji genów *BRCA1* i 2 oferuje się osobom z ryzykiem zachorowania powyżej 30% (tab. 2).

Tabela 2. Prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji genu *BRCA1* lub *BRCA2* u kobiet z dziedzicznym rakiem piersi/jajnika. [54, 35]

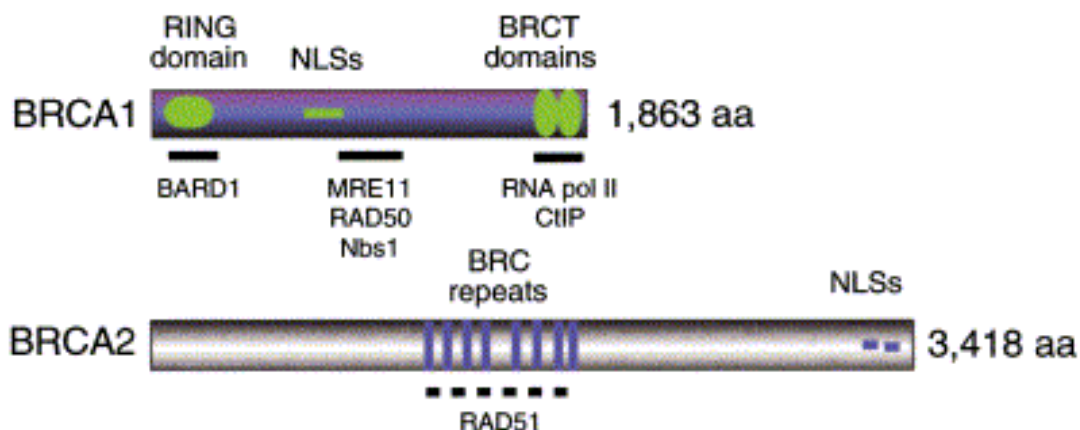
Ryzyko mutacji	Kryteria kliniczne
<10%	Pojedynczy przypadek raka piersi/jajnika poniżej 40 r.ż. z wyłączeniem populacji Żydów Aszkenazyjskich
10-30%	2-3 przypadki raka piersi < 60 r.ż. (nieobecność raków jajnika lub raka piersi u mężczyzn)
30%	Jeden rak piersi < 60 r.ż. i jeden rak jajnika Jeden rak piersi < 40 r.ż. w populacji Żydów Aszkenazyjskich
>60%	Cztery przypadki raka piersi < 60 r.ż. ≥ Dwa przypadki raka piersi < 60 r.ż. oraz rak jajnika w dowolnym wieku ≥ Dwa przypadki raka piersi < 60 r.ż. oraz rak piersi u mężczyzny w dowolnym wieku

Należy dodać, że badania wymienionych wyżej genów nie tłumaczą wszystkich rodzinnych agregacji zachorowań na raka jajnika. Istnieją rzadkie zespoły, w których odnotowuje się zwiększone ryzyko zachorowania na raka jajnika, wynikające z mutacji germinalnych genów: *TP53* i *CHK2* w zespole Li-Fraumeni lub *STK11/LKB1* w zespole Peutz-Jeghersa. Nie jest wykluczone, że istnieją też inne geny podatności o wysokiej lub średniej penetracji: hipotetyczny *BRCAX*, który może być zlokalizowany np.: w regionie chromosomu 8p11-21, gdzie stwierdza się wysoką częstością zjawiska LOH (46-74% nieselekcjonowanych raków piersi) [26]. Alternatywnym modelem jest założenie kombinacji licznych, częstych wariantów genetycznych o niskim ryzyku, np.: różnych alleli polimorficznych [138].

2.9.1. Geny *BRCA1* i *BRCA2* - lokalizacja cytogenetyczna, struktura oraz funkcje produktów białkowych

Gen *BRCA1* jest zlokalizowany na chromosomie 17q12-21, składa się z 22 kodujących eksonów, a na końcu 5'-UTR znajdują się dwa alternatywnie przepisane eksony 1a i 1b. Jest to duży gen, który obejmuje około 80 kb DNA bogatego w sekwencje repetytywne Alu. 61% sekwencji kodującej

znajduje się w obrębie ogromnego eksonu 11 (3,4 kb). Dwie najważniejsze domeny: RING *zinc finger* w N-końcu i powtórzenia BRCT (*BRCA1 carboxyl terminus*) w C-końcu (ryc.1) są wysoce konserwowane u kręgowców, natomiast reszta struktury posiada niewielką homologię z innymi białkami o znanych funkcjach [54]. 7,8 kb mRNA jest głównie transkrybowane w jądrach, tarczycy, jajniku i gruczole piersiowym. Wykrywa się wiele alternatywnie składanych transkryptów *BRCA1*, które są przeważnie pochodnymi delekcji w obrębie ramki odczytu eksonu 11. Pełnej długości 220-kD białko zlokalizowane jest przede wszystkim w jądrze komórkowym. Poziom ekspresji białka i jego fosforylacji jest zależny od fazy cyklu komórkowego, rozpoczyna się w fazie G1 i osiąga maksimum we wczesnej fazie S. Wynika to z funkcji białka *BRCA1* biorącego udział w procesach naprawy DNA. W guzach nosicieli germlinalnej mutacji *BRCA1* w tkance nowotworowej ekspresja prawidłowego białka jest zniesiona. W przypadku raków sporadycznych stwierdza się również brak ekspresji tego białka lub jego redukcję w tkance nowotworowej [12].



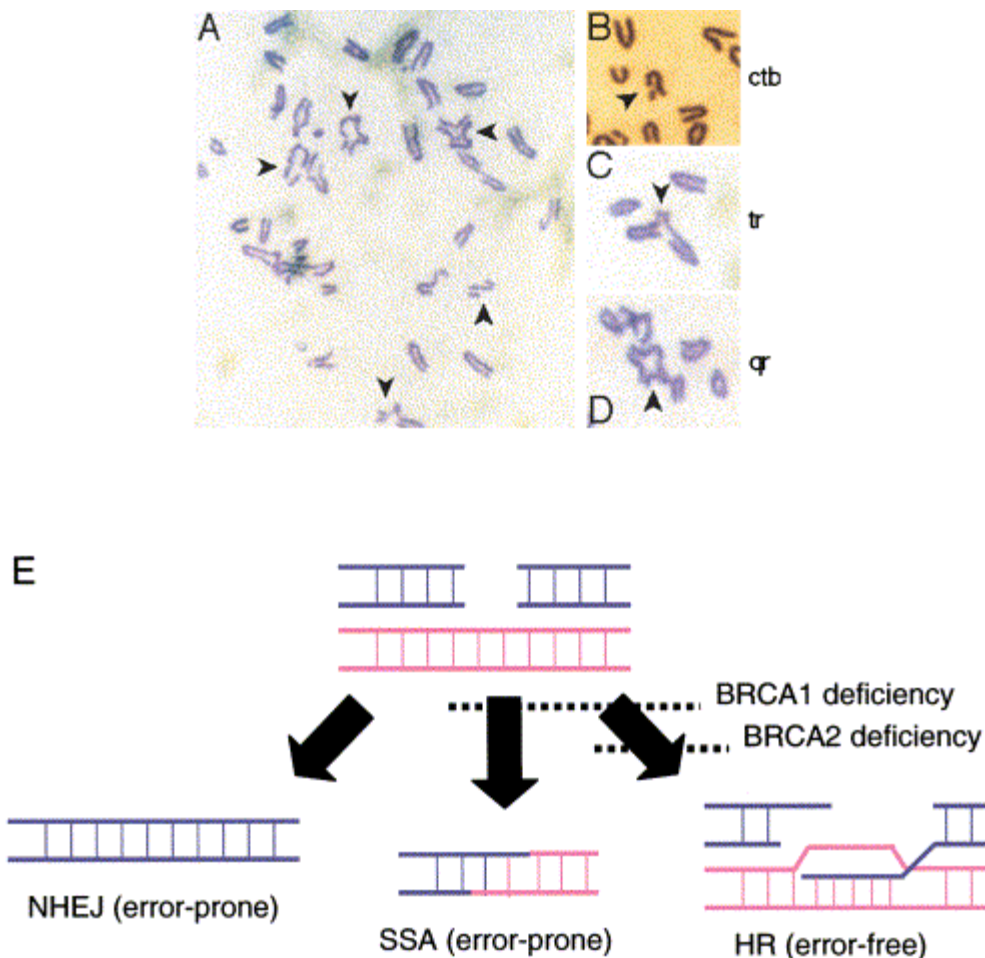
Rycina 1. Schemat budowy genów *BRCA1* i *BRCA2* [177]

Gen *BRCA2* został zlokalizowany na chromosomie 13q12-13, składa się z 27 eksonów, gdzie podobnie jak w genie *BRCA1*, ekson 11 jest szczególnie duży (4,9 kb). Jest to również duży gen o długości około 70 kb, kodujący transkrypt wielkości od 11 do 12 kb i kodujący białko złożone z

3418 aminokwasów. Ekson 11 koduje szczególny motyw strukturalny, złożony z ośmiu powtórzeń 30-80 aminokwasów BRC, poprzez który BRCA2 kontroluje działanie RAD51, rekombinazy uczestniczącej w naprawie DNA na bazie homologicznej rekombinacji (HR) (ryc. 1). Wzór ekspresji BRCA2 jest podobny do BRCA1, ale podwyższony poziom tej ekspresji występuje w gruczole piersiowym i tarczycy a nieco mniejszy w tkance płucnej, jajniku i śledzionie. W prawidłowych komórkach BRCA2 jest białkiem jądrowym, głównie ulegającym ekspresji w fazie G1/S. Wówczas jest wykrywane w ziarnistościach jądrowych wraz z białkami BRCA1 i RAD51 [12, 34].

Białka powstające na matrycy genów *BRCA1* i *2* są białkami szczególnymi, które nie przypominają budową innych białek. Powstały one najpewniej późno w procesie ewolucji i mają odgrywać szczególną rolę w komórkach ssaków, pełniąc w nich liczne, tkankowo specyficzne funkcje [187].

Zarówno na modelach zwierzęcych *in vivo* jak i w komórkach hodowanych *in vitro* z brakiem ekspresji BRCA1 lub BRCA2 stwierdza się występowanie spontanicznych rearanżacji chromosomów, jak translokacje i delecje, fuzje licznych, niehomologicznych chromosomów oraz rearanżacje chromatydowe. Taka spontaniczna łamliwość chromosomów jest typowa dla takich chorób dziedzicznych jak zespół Fanconiego lub Blooma, gdzie występuje wysokie ryzyko zachorowania na nowotwór. Geny *BRCA* wydają się być genami „opiekuńczymi”, których nieprawidłowości powodują niestabilność genomu, co promuje narastanie kolejnych błędów w genach kontrolujących cykl komórkowy, podział i śmierć komórki, w efekcie czego powstaje klon nowotworowy. Zarówno białko BRCA1 jak i BRCA2 są zaangażowane w działanie mechanizmów naprawczych uruchamianych w przypadku pęknięć dwuniciowego DNA. Najpewniej brak lub nieprawidłowe białka BRCA powodują włączenie się i przewagę w komórce z uszkodzeniami DNA mniej korzystnych mechanizmów naprawczych typu NHEJ (*nonhomologous end-joining*) i SSA (*single-strand annealing*), które są obarczone powstawaniem błędów prowadzących do translokacji i delecji chromosomowych. Tłumiony jest proces HR (*homologous recombination*), który jest procesem, który w sposób wierny przywraca prawidłową sekwencję DNA (ryc.2) [187].



Rycina 2. Aberracje chromosomowe i różne typy rearanżacji chromatydowych (A-D) w komórkach mysich z nieaktywnym białkiem BRCA2. Poniżej mechanizmy naprawcze pęknięć dwuniciowego DNA (NHEJ, SSA), które są preferowane, gdy białka BRCA są nieaktywne. Tłumiony jest proces HR (E) [187].

Główną rolą białka BRCA2 wydaje się być wiązanie się bezpośrednio z białkiem RAD51, bez którego naprawa HR jest niemożliwa. Dzieje się to za pomocą motywów BRC zapewniających wysoką stabilność wiązania pomiędzy dwoma białkami. RAD51 łączy się z ssDNA, tworzy nukleoproteinowe włókno, które penetruje i łączy się z homologicznymi dupleksami DNA, aby następnie inicjować wymianę nici pomiędzy sparowanymi cząsteczkami DNA.

Rola białka BRCA1 jest odmienna od BRCA2 i jest ono prawdopodobnie przekaźnikiem pomiędzy systemami wykrywającymi i sygnalizującymi, a wykonawczym w procesie naprawy DNA. Jest białkiem

sprawdzającym poprawność odpowiedzi mechanizmu naprawczego w stosunku do wielkości uszkodzenia inicjującego ten mechanizm. Jest to białko biorące udział w HR, podobnie jak BRCA2, ale znacznie mniej wiadomo, jaka jest jego rola w tym zjawisku. BRCA1 wcześniej migruje do miejsca uszkodzenia, gdzie oddziałuje z szeregiem różnych białek. Znane są interakcje z kompleksem białkowym MRE11/RAD50/NBS1, gdzie *in vitro* wykazano, że BRCA1 może hamować w MRE11 aktywność nukleazy. Stabilizuje poprzez to trwałość fragmentów ssDNA w miejscach naprawy DNA, które jest materiałem wykorzystywanym w mechanizmach HR i SSA. W komórkach, w których brak BRCA1 te mechanizmy naprawcze są defektywne w przeciwieństwie do NHEJ. Reaguje także z enzymami zmieniającymi strukturę chromatyny i DNA oraz z helikazami DNA. Prawdopodobnie białko BRCA1 jest regulatorem transkrypcji, podobnie być może działa BRCA2. BRCA1 może oddziaływać z holoenzymem polimerazy RNA II poprzez komponent helikazy.

Białko BRCA1 jest natychmiast fosforylowane w dzielących się komórkach, w których doszło do uszkodzenia DNA. Wiadomo, że fosforyluje go kinazy: ATM, ATR i CHK2, w zależności od czynnika uszkadzającego. Ma to znaczenie w uruchomieniu kontroli cyklu komórkowego S i G2. Z BRCA1 wiąże się poprzez domenę RING białko BARD1 mające znaczenie w procesach kontroli RNA po uszkodzeniu DNA. W przypadku ostatniego zachodzi inhibicja cięcia końca 3' w procesie dojrzewania mRNA. Ostatnio została również zidentyfikowana aktywność E3 ligazy ubikwityny w heterodimerach BARD1-BRCA1, która może być zaangażowana w degradację białek zawiadujących obróbką RNA [53, 187].

2.9.2. Metody badania genów

Badania molekularne genów *BRCA1* i *BRCA2* można prowadzić na poziomie DNA, RNA jak również produktu białkowego, szukając nie tylko zmian w sekwencji nukleotydów, ale też w ekspresji i funkcji produktów białkowych. Wstępna diagnostyka molekularna w populacjach, w których przeważa wybrana jedna/kilka zmian genetycznych polega na badaniu tylko wybranych mutacji prostym testem opartym o technikę PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy), a następnie rozdział elektroforetyczny. Może to być

badanie techniką RFLP (polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych), gdy mutacja tworzy lub usuwa miejsca restrykcyjne. Inną techniką jest ASA-PCR, czyli reakcja PCR z wykorzystaniem starterów flankujących badaną sekwencję i jeden starter specyficzny dla allelu z mutacją [91]. Przykładem zastosowania obu tych technik jednocześnie może być opracowany przez Zakład Genetyki i Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie test DNA oparty o technikę *multiplex*-PCR (równoczesnej amplifikacji wielu różnych fragmentów DNA) służący do wykrywania w prosty sposób trzech często występujących w Polsce mutacji genu *BRCA1* [60].

W innych populacjach, „złotym standardem” będzie badanie pełnej sekwencji genu albo części kodującej, poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie, czyli ustalenie kolejności nukleotydów w badanym fragmencie DNA. Przede wszystkim wykorzystuje się metodę Sanger, opartą o użycie dideoksynukleotydów (ddNTP) znakowanych fluorescencyjnie, która pozwoliła na zautomatyzowanie procesu czytania sekwencji. Jest to technika czuła i wysoce specyficzna, lecz w przypadku tak dużych genów jak np. *BRCA1* konieczne jest sekwencjonowanie do czterdziestu fragmentów ekson po eksonie, co bardzo podwyższa koszty diagnostyki. W celu ich obniżenia, sekwencjonowanie można poprzedzić zastosowaniem technik przesiewowych, wykrywających zmiany w materiale genetycznym takich jak np.: SSCP (analiza konformacji pojedynczych nici DNA), HA (analiza heterodupleksów) i wariantów połączenia tych dwóch technik, DGGE (denaturacyjna elektroforeza gradientowa), lub PTT (test przedwczesnej terminacji translacji) i inne [91].

Denaturacyjna wysokosprawnościowa chromatografia cieczowa (DHPLC), będąca pochodną techniki HA wykorzystuje wysoką rozdzielczość nowoczesnych wypełnień kolumn chromatograficznych. Jest także techniką bardzo przyspieszającą badanie przesiewowe zmian w materiale genetycznym o nieznannej naturze i lokalizacji poprzez całkowitą automatyzację oraz bardzo wysoką czułość i specyficzność (od 96 do 100%) [190]. Zmiany o charakterze heterozygotycznym mają stosunek alleli dzikich i zmutowanych 1:1. Poprzez denaturację produktu PCR w temperaturze 95° i powolne schładzanie uzyskujemy mieszaninę hetero- i homodupleksów (homozygoty dzikie utworzą jedynie homodupleksy złożone z alleli dzikich).

Rozdział fragmentów kwasów nukleinowych jest oparty o ich wielkość, sekwencję i pozycję mutacji, i temperaturę odpowiednią do częściowej denaturacji heterodupleksów DNA. Hetero- i homodupleksy mają różny czas retencji w *DNASep Catridge matrixs*, co zostaje uwidocznione jako charakterystyczny wzór pików. Allele zmutowane znajdujące się produkcie PCR z częstością 20% znajdowane są z użyciem DHPLC w prawie 100%, natomiast w sekwencjonowaniu tylko w 80%. Metoda ta może być techniką z wyboru w przypadku podejrzeń mozaicyzmu w badanej próbce lub heteroplazmii. Jest też oceniana na co najmniej 10 razy tańszą metodę od sekwencjonowania [198].

Część kodującą genu można badać w oparciu o izolację całkowitego RNA, uzyskanie cDNA w RT-PCR (odwrotna transkrypcja z reakcją PCR) oraz analizę na bazie wymienionych wcześniej metod lub bezpośredniego sekwencjonowania uzyskanych fragmentów. Zmniejsza to zakres badanych nukleotydów i pozwala na wykrycie np. mutacji *splicingowych*.

Wykrywanie dużych przemieszczeń materiału genetycznego wymagało dotąd zastosowania techniki opartej o hybrydyzację - metody Southerna, która jest bardzo pracołłonna i wymaga użycia próbek DNA bardzo dobrej jakości. Obecnie dla genów *BRCA* są wprowadzane do rutynowej diagnostyki specjalne zestawy wykrywające duże delecje/insercje – MLPA (*multiplex ligation dependent probe amplification*) [71].

Szacuje się, że nawet przy wykorzystywaniu wszystkich znanych technik czułość bezpośredniego wykrywania zmian wynosi obecnie około 70-80%, z powodu ograniczeń technicznych poszczególnych technik, a także ze względu na niemożność rozpoznania zaburzeń w nieznanym sekwencjach regulujących funkcjonowanie genów, które mogą być zlokalizowane w innym regionie genomu [91].

Delecje fragmentów DNA, które obejmują okolicę genów zaangażowanych w transformację nowotworową można badać poprzez wymienianą wcześniej utratę heterozygotyczności – LOH (*loss of heterozygosity*). Zjawisko LOH jest prawdopodobnym mechanizmem inaktywacji genów supresorowych zgodnie z teorią „dwóch uderzeń” Knudsona. Technika ta jest jedną z wykorzystywanych w klonowaniu pozycyjnym genów supresorowych. Idealnym przykładem utraty jest delecja

obu alleli jako marker lokalizacji genu supresorowego, tak jak miało miejsce w przypadku genu *BRCA2*. W celu oceny delecji używa się markerów polimorficznych rozrzuconych w ludzkim genomie. Badanie może polegać na różnicy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), lub częściej wykorzystywanej różnicy długości alleli w powtórzeniach dwupięcionukleotydowych VNTR. Wybiera się markery mikrosatelitarne o znanej lokalizacji chromosomowej i wysokiej heterozygotyczności. W tej technice porównuje się zamplifikowane allele z DNA prawidłowego (z limfocytów krwi obwodowej lub tkanek prawidłowych) z DNA uzyskanym z komórek nowotworowych. Analizę można przeprowadzać densytometrycznie lub z użyciem automatycznego sekwenatora. Ostatnio, markery mikrosatelitarne amplifikowane z użyciem modyfikowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów są szeroko wykorzystywane do analizy na automatycznym sekwenatorze ABI PRISM 373 lub 310 z użyciem oprogramowania GENESCAN (Applied Biosystem) [101].

Markery mikrosatelitarne wykorzystuje się także do analizy sprzężeń, gdzie zakłada się, że marker zlokalizowany w pobliżu genu odpowiedzialnego za dany fenotyp dziedziczy się wraz z nim w sposób sprzężony. Technika ta może być wykorzystywana w analizie kosegregacji mutacji w rodzinach, niestety tylko licznych, wielopokoleniowych i gdzie jest kilka osób dotkniętych badanym schorzeniem.

2.9.3. Częstości mutacji genów *BRCA1* i *2* oraz ich spektrum mutacji

W większości populacji kaukaskich, z wyłączeniem Żydów Aszkenazyjskich, częstość heterozygotycznego nosicielstwa mutacji germinalnych *BRCA1* lub *BRCA2* jest oceniana na około 1 na 800. Jest to nieco niższa częstość niż w populacjach azjatyckich i afrykańskich. Natomiast w ogólnej populacji osób pochodzenia Aszkenazyjskiego częstość nosicielstwa mutacji jest uderzająco wysoka i wynosi 1 na 40 (ponad 1% populacji). W tej populacji, jak i w innych o specyficznym położeniu geograficznym lub pochodzeniu etnicznym efekt założyciela spowodował, że wybrane mutacje stały się szczególnie częste. W przypadku populacji Żydów Aszkenazyjskich większość mutacji stanowią trzy germinalne: 185delAG, 5382insC w *BRCA1* i 6174delT w *BRCA2*. Nawet bez obciążonego wywiadu

rodzinnego 26-60% żydowskich kobiet będzie nosicielkami którejs z tych trzech mutacji. A zatem w populacji tej samo zachorowanie na raka jajnika powinno być wskazaniem do udzielenia porady genetycznej i wykonania diagnostyki molekularnej [177]. Mutacje germinalne są dziedziczone z pokolenia na pokolenie i dzięki technikom rekombinacji określono czas powstania powyższych mutacji na okres wczesnoromański. Mutacje te rzadko wykrywa się *de novo* [53].

Liczba mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* znajdujących się w bazie *Breast Cancer Information Core* [BIC] liczy sobie ponad 2000 różnych mutacji, polimorfizmów i wariantów o nieznannej funkcji [180]. Mutacje w obu genach są w zasadzie rozproszone w obrębie całej sekwencji kodującej. Oprócz 185delAG i 5382insC, które występują z wysoką częstością i stanowią około 22% wszystkich wykrywanych mutacji, pozostałe są rzadkie i wiele z nich jest unikatowa, co powoduje, że w większości populacji na świecie badanie celowane w określonym regionie genu jest niemożliwe [138].

Większość mutacji w genie *BRCA1* to mutacje typu braku sensu, przesunięcia ramki odczytu, mutacje *splicingowe* i regulatorowe. Wszystkie te mutacje powodują skrócenie produktu białkowego podczas translacji lub jego brak (około 87% wszystkich mutacji germinalnych w genie *BRCA1*). W pewnych populacjach zaobserwowano obecność dużych interstycjalnych delecji lub insercji, które są bardzo trudne do wykrycia konwencjonalnymi metodami poszukiwania mutacji opartymi na technice PCR. Prawdopodobnie stanowią one około 10-20% wszystkich mutacji [71, 152]. W genie *BRCA1* wykrywa się również mutacje typu zmiany sensu (*missense*) i delecje *in-frame*, ale dla większości z nich brak pewnego potwierdzenia, że są zmianami mającymi znaczenie kliniczne. Jedynie mutacje *missense*, które pojawiają się w resztach cysternowych w domenie *RING finger* są jasno powiązane ze skłonnością do nowotworzenia. Przykładem jest jedna z mutacji założycielskich: 300T/G.

W Polsce prowadzone przez kilka ośrodków badania nad rodzajem i częstością mutacji *BRCA1* i 2 rodzin podwyższonego ryzyka zachorowania na raka piersi i/lub jajnika wykazały częstość mutacji wysokości 27-64% [57, 59, 64, 135, 169]. Wstępne badanie przeprowadzone na grupie kontrolnej 200 rodzin polskich z obciążonym wywiadem wybranych z różnych regionów

Polski wykazały, że nosicielstwo mutacji 5382insC, 300T/G i 4154delA w genie *BRCA1* wynosi 0,6% z proporcją tych mutacji 6:2:1. Na podstawie danych zebranych do końca 2002 roku, Zakład Genetyki i Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie szacunkowo przyjmuje, że w Polsce może być nawet 100.000 nosicielek i tyle samo nosicieli mutacji *BRCA1* [60].

Dotychczasowe badania sugerują, że w Polsce efekt założyciela dotyczy mutacji 5382insC i 300T/G, które w poszczególnych pracach opiewały na 25,5-71% częstości wśród innych wykrytych mutacji. [57, 59, 79, 135] W przypadku mutacji 4154delA nie stwierdzono jej obecności w kolejnych badaniach przeprowadzonych w różnych regionach Polski, również w naszej populacji z Polski północno-wschodniej. Dotychczasowe wyniki z naszego ośrodka potwierdziły, że kolejnymi w częstości powtarzającymi się mutacjami w genie *BRCA1* są 185delAG, wymieniana wcześniej jako mutacja występująca wśród osób pochodzenia żydowskiego oraz 3819del5, która jest zgłaszana z różnych krajów europejskich: Niemiec, Danii, Czech, Francji, jak również Australii i USA. Różnice w liczbie wykrytych mutacji mogą wynikać z kryteriów kwalifikacji chorych do badań oraz różnych technik wykrywania mutacji i ich niedostatecznej czułości. Inną przyczyną mogą być różnice etniczne wśród poszczególnych subpopulacji w Polsce i złożona historia naszego państwa, w której występowały duże migracje ludności [79, 135]. Katedra Biologii i Genetyki AMG uczestniczy w wieloośrodkowym badaniu epidemiologicznym, które pozwoli na określenie częstości nosicielstwa mutacji założycielskich w genie *BRCA1* w populacji polskiej.

Mutacje w genie *BRCA2* w badanych populacjach występują w całej części kodującej genu. Dominują dwie mutacje: 6174delT i 999del5, których częstość stanowi około 33% wszystkich zmian germinalnych. 6174delT to mutacja bardzo częsta w populacji Żydów Aszkenazyjskich (1-1,5% populacji) natomiast 999del5 jest charakterystyczną mutacją dla rodzin wysokiego ryzyka zachorowania na raka piersi w Islandii (0,6% populacji). Również w genie *BRCA2* mutacje mają najczęściej charakter zmian *frameshift* z przewagą małych delecji. W przypadku genu *BRCA2* również znajduje się bardzo wiele mutacji zmiany sensu, których liczebność zaczyna

sięgać aż 50% wszystkich znanych zmian w sekwencji genu. Brak jest funkcjonalnego testu, którym można by było zbadać ich znaczenie [138, 34]. Jak dotąd nie udało się w populacji polskiej wykryć podwyższonej częstości określonych mutacji w genie *BRCA2*.

Somatyczne mutacje genów *BRCA1* (7-10%) i 2 (4%) są wykrywane w tkance nowotworowej jajnika rzadko i były przedmiotem badań niewielu badaczy [117, 74]. Wyniki tych badań potwierdzają funkcję *BRCA1/2* jako genów supresorowych zgodnie z teorią Knudsona.

2.9.4. Nosiciele mutacji germinalnych genu *BRCA1* i 2 a ryzyko rozwoju raka

Początkowo ryzyko rozwoju raka piersi i jajnika oceniano na wysokie w oparciu o analizę rodowodów rodzin, w których występowały liczni nosiciele mutacji w genie *BRCA1* [44]. Obecnie prowadzone badania na różnych populacjach wykazują, że ryzyko to jest niższe. Może to wynikać z faktu, iż w poszczególnych populacjach występują mutacje o różnym stopniu penetracji. Mogą to też być także wpływy wariantów innych genów, które modyfikują działanie produktów genów *BRCA1* i 2. Dodatkowo, mogą to też być środowiskowe modyfikatory ryzyka specyficzne dla każdej populacji.

U nosicieli mutacji *BRCA1* ryzyko pojawienia się raka jajnika zaczyna się zwiększać począwszy od wieku 40 lat. Penetracja wynosi 44-60% w wieku 70 lat. A więc jest to ryzyko zdecydowanie wyższe niż ryzyko zachorowania na sporadycznego raka jajnika 1,8% wśród kobiet z krajów wysoko rozwiniętych [53].

Z kolei u nosicieli mutacji *BRCA2* podwyższone ryzyko rozwoju raka jajnika pojawia się później, bo począwszy od wieku 50 lat i wynosi 27% w wieku 70 lat. Oznacza to, że pojawienie się raka jajnika w późniejszym wieku u kobiety nie wyklucza obecności mutacji w którymś z tych genów [53, 44]. W przypadku obu genów najwyższe ryzyko dotyczy zachorowania na raka piersi i sięga około 85% w wieku 70 lat. Ponadto u nosicieli mutacji genu *BRCA*, obok tych dwóch nowotworów, jest również podwyższone ryzyko wystąpienia raka jelita grubego, endometrium, szyjki macicy, jajowodu i otrzewnej. Podobnie, u nosicieli mutacji w genie *BRCA2*, oprócz podwyższonego ryzyka raka piersi u kobiet oraz u mężczyzn istnieje ryzyko pojawienia się raka jajowodu, trzustki, żołądka, dróg żółciowych, prostaty i czerniaka skóry [53].

Podane powyżej ryzyka wystąpienia raka przyjmuje się jednakowe dla poszczególnych mutacji. Jednakże są prace, które sugerują, że różne nieprawidłowe allele genów *BRCA* mają różny efekt kliniczny. Już prace *Breast Cancer Linkage Consortium* wykazały, że istnieją rodziny, gdzie w większości jest wyraźnie wyższe ryzyko zachorowania na raka piersi i niższe zachorowania na raka jajnika. Została opisana niewielka grupa rodzin, gdzie ryzyko zachorowania na raka piersi i jajnika jest jednakowo wysokie [44, 138]. Co więcej, sugeruje się, że mutacje zlokalizowane w pierwszych 2/3 genu *BRCA1* niosą wyższe ryzyko raka jajnika w stosunku do raka piersi, niż te zlokalizowane bliżej końca 3' [48, 138]. W przypadku *BRCA2*, mutacje skracające białko występujące w rodzinach z wysokim ryzykiem raka jajnika, skupiają się w centralnej części genu zwanej OCCR (*ovarian cancer cluster region*) wielkości ok. 3,3 kb w eksonie 11 między nukleotydami 3059-4075 i 6503-6629. Mutacje OCCR są związane ze znamienne niższym ryzykiem raka piersi (*RR* 0,63) i znamienne wyższym ryzykiem raka jajnika (*RR* 1,88). Można to wytłumaczyć powiązaniem pomiędzy lokalizacją OCCR i domeną wiążącą RAD51 [182].

Publikacje określające znamienne zależności pomiędzy genotypem, a obrazem klinicznym są wciąż nieliczne, a liczebności badanych grup chorych w większości prac są niewielkie [157].

W badaniu retrospektywnym na populacji żydowskiej, nosicielki mutacji genu *BRCA* z rakiem jajnika w wysokim stopniu zaawansowania klinicznego III miały dłuższe czasy przeżycia i dłuższy średni czas wznowy niż kobiety ze sporadycznymi rakami (14 miesięcy *versus* 7 miesięcy; $p < 0,001$) [15]. W innych doniesieniach, gdy do analizy wieloczynnikowej zostały włączone przypadki z wczesnymi stadiami rozwoju raka, nie uzyskano takiej znamienności [137, 81]. Chore na raka jajnika z wykrytą mutacją w genie *BRCA* wydają się mieć lepsze rokowanie w porównaniu z chorymi z guzami sporadycznymi. [9] Należy jednak zweryfikować, czy jest to po prostu wynik skuteczniejszej detekcji nowotworu w tej populacji, czy może lepszej odpowiedzi na leczenie [54].

Zaobserwowano, że raki wykrywane u nosicieli mutacji *BRCA1* i 2 są w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego i o wysokim stopniu złośliwości histologicznej [158, 137, 10, 81]. Ponadto opisano korelacje

pomiędzy obecnością u nosicielek mutacji w genach *BRCA1* i *2* a obrazem histopatologicznym raka jajnika. U pacjentek z mutacją genu *BRCA1* lub *2* częściej obserwuje się gruczolakoraki surowicze, surowiczo-brodawkowate, nisko zróżnicowane oraz obecność przerzutów w mózgu [85]. Wydaje się też, że obniżona jest liczba raków śluzowych w stosunku do przypadków sporadycznych. Stwierdza się również niższą wykrywalność raków o granicznej złośliwości [15, 138].

Nosicielki mutacji *BRCA1/2* prezentują również lepszą odpowiedź na pierwotne leczenie chemiczne w porównaniu z chorymi na raka sporadycznego i mają dłuższe przeżycia w zaawansowanych postaciach raka [20]. Ponieważ zarówno gen *BRCA1* jak i *BRCA2* odgrywają rolę w działaniu mechanizmów naprawczych DNA, komórki raka, w których brak tych białek, mają wzmożoną podatność na działanie chemioterapii, która powoduje np. uszkodzenia pęknięcia dwuniciowego DNA. Działanie takie wykazują stosowane często w terapii raka jajnika analogi platyny, antracykliny i promieniowanie jonizujące. Badania *in vitro* wykazały, że brak lub hamowanie produktu genu *BRCA1* wzmacnia wrażliwość komórek rakowych na działanie cisplatyny przy równoczesnej podwyższonej oporności na leki działające na mikrotubule, czyli taksany [177].

Ryzyko rozwoju raka jajnika można zredukować poprzez przyjmowanie doustnych środków antykoncepcyjnych zawierających estrogen i gestageny. Zaobserwowano taką zależność nie tylko w ogólnej populacji z danych z rejestru *Gilda Radner* [143], ale też wśród nosicielek mutacji w genie *BRCA1* lub *2* [121, 193]. W porównaniu 232 chorych na raka jajnika oraz 232 zdrowych kontroli, przyjmowanie doustnej antykoncepcji redukowało ryzyko wystąpienia raka jajnika aż o 56%. W przypadku ryzyka zachorowania na raka piersi najnowsze doniesienia podają, że jest ono niepodwyższone, a nawet stosowanie antykoncepcji hormonalnej zgodnie z najnowocześniejszymi zaleceniami może je zredukować [193].

Profilaktyczne wycięcie jajników obniża u nosicielek mutacji genu *BRCA1* ryzyko raka piersi o 56%, a u *BRCA2* o 46% [36]. Profilaktyczna oophorectomia nie zabezpiecza przed rozwojem pierwotnego raka otrzewnej, który jest nowotworem związanym ze spektrum *BRCA1/2* [143]. W wyniku zabiegu dochodzi do menopauzy chirurgicznej, której objawy mogą być

bardzo dokuczliwe, a zapobieganie im przez podanie krótkotrwałej HTZ obecnie jest oceniane jako niezwiększające ryzyka raka piersi [149]. Podwiązanie jajowodów ma również działanie protekcyjne przeciwko rakowi jajnika – obniża ryzyko o 61%, a w połączeniu ze stosowaniem doustnej antykoncepcji o 72%. Nie zaobserwowano tego ochronnego efektu dla nosicielek mutacji *BRCA2* [122]. Istnieje sugestia, iż komórki rakowe mogą powstawać w nabłonku wyściełającym jajowód i stamtąd być transportowane do jajnika a podwiązanie jajowodów przerywa tę drogę [140].

Coraz więcej pojawia się doniesień o molekularnych modyfikatorach ryzyka u nosicieli mutacji genów *BRCA1* i 2, co wynika z różnic pomiędzy ryzykiem i przebiegiem choroby w różnych rodzinach, w których wykrywano te same mutacje. Obecność rzadkiego allelu genu *HRAS1* podwyższa ryzyko u nosicieli mutacji genu *BRCA1* o 2,11x w stosunku do nosicieli z częstymi wariantami tego genu [139]. Wariant receptora progesteronowego nazwany PROGINS był związany z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika u nosicielek mutacji genów *BRCA 1/2*, które wcześniej nigdy nie przyjmowały doustnej antykoncepcji [161]. Wymienia się także jednonukleotydowy polimorfizm 135C/G w nie ulegającej translacji 5' części genu *RAD51*, który podwyższa ryzyko rozwoju raka piersi i obniża ryzyko raka jajnika u nosicielek mutacji *BRCA2* [99].

2.10. Utraty heterozygotyczności (LOH) loci genów *BRCA1* i *BRCA2*

Utrata heterozygotyczności jest często znajdowana w locus genu *BRCA2* w 46-56% raków sporadycznych jajnika oraz w 29-56% sporadycznych raków piersi. W przypadku sporadycznego raka piersi u mężczyzn, Kwiatkowska i wsp. [94] wykryli liczne LOH (82,6%) w regionie 13q12-13. W badanym materiale 23 sporadycznych raków piersi u mężczyzn znaleźli również 5 (21%) mutacji somatycznych genu *BRCA2*, co świadczy o zaangażowaniu tego regionu w kancerogenezę raka piersi u mężczyzn.

Utratę heterozygotyczności w jednym lub więcej spośród czterech markerów z locus genu *BRCA1* badanych w rakach jajnika zaobserwowano u wszystkich (15) pacjentek z nieprawidłowością w genie *BRCA1*. W przeciwieństwie do tej grupy, w DNA z raków jajnika bez zmian w *BRCA1* znaleziono zaledwie 58% utrat [10]. Na podstawie badania utrat

heterozygotyczności część autorów stwierdza, że w guzach pochodzących od osób z dziedziczną postacią raka piersi i/lub jajnika geny *BRCA1* i *2* działają jako geny supresorowe, a mutacje germinalne są silnie związane z utratą allele dzikiego w guzie [10, 61].

LOH w regionie 13q12-14 występuje niemal wyłącznie w rakach nabłonkowych jajnika. Podobnie dzieje się w przypadku utrat z locus genu *BRCA1* i w obu przypadkach przeważają postacie surowicze raków. Utraty regionów 13q12-14 i 17q współistnieją ze sobą w większości badanych guzów. Sugeruje to jednoczesny udział obu genów w rozwoju raków sporadycznych jajnika, szczególnie o zróżnicowaniu surowiczym [61].

Uczestnictwo białek BRCA w procesach naprawy DNA sugeruje, że mogą one nie działać jako proste supresory, ale mogą być zaangażowane w sieć genów odpowiedzialnych za integralność genomu. Utrata tych genów może prowadzić pośrednio do mutacji lub do aktywacji onkogenów. Wysoka częstość mutacji genu *TP53* w guzach jajnika i piersi u nosicieli mutacji *BRCA1* wydaje się oznaczać, że poprzez utratę ważnego regulatora cyklu komórkowego TP53 dochodzi do wzrostu komórek z utratą funkcji obu alleli genu *BRCA1* lub *BRCA2*. Jeśli dojdzie do LOH w genie *BRCA* u nosiciela mutacji geminalnej, to doprowadzi to do zatrzymania cyklu komórkowego i/lub apoptozy. Mutacja dominująca w genach na jego drodze oddziaływań komórkowych zniesie ten proces i dojdzie do proliferacji komórki. Z drugiej strony u nosiciela mutacji germinalnej *BRCA* wpieryw może dojść do utraty funkcji TP53. W komórkach z utratą funkcji obu alleli genu *TP53* obserwuje się zwielokrotnienie liczby centrosomów, co doprowadza do aneuploidii prowadzącej do utraty allele dzikiego *BRCA* [12]. W pracy przeprowadzonej na dwóch grupach wiekowych 78 kobiet z wczesnymi rakami piersi (≤ 40 r.ż.) oraz u pacjentek >50 r.ż. wykazano, że LOH z locus genu *BRCA1* oraz nadekspresja TP53 korelowały ze sobą w grupie młodszych pacjentek i były związane z krótszym czasem przeżycia bez choroby i krótszym całkowitym przeżyciem [148].

Na chromosomie 17q wyróżnia się aż trzy duże regiony utrat LOH w raku jajnika: 17q12.2 – locus *NF1*, 17q21 zawierający *BRCA1* oraz 17q25.1-qter. W badaniu 76 raków jajnika w 39 próbkach wykryto LOH w regionie 17q23-25 i zawężono minimalny region delecji do 17q25 pomiędzy D17S795

i D17S801. Ponieważ jeden z guzów granicznych wykazał interstycjalny wzór utrat obejmujący ten region autorzy postulują, że w tym regionie może znajdować się nowy gen supresorowy istotny dla rozwoju różnych postaci histologicznych raków nabłonkowych jajnika [28]. W końcowym odcinku 17q zmapowano gen ludzkiej septyny (*Ov/Br*), aczkolwiek określenie roli tego genu jako genu supresorowego wymaga dalszych badań [101].

W przypadku chromosomu 13q obserwowano utraty nie tylko z regionu genu *BRCA2* (13q12-13), ale również z 13q11, q14, q21, q22-31, q32 i q32-34. Autorzy sugerują obecność w tych miejscach nowych genów supresorowych [82].

We wcześniejszej części wstępu omówiono zjawisko rzadkiego występowania mutacji somatycznych zarówno w genie *BRCA1* jak i *BRCA2*. Utrata aktywności genów supresorowych może przebiegać również poprzez kombinację mechanizmu utraty heterozygotyczności i zdarzeń epigenetycznych takich jak metylacja promotora. W badaniu ekspresji białka *BRCA1* w 76 rakach jajnika uwidoczono redukcję jego ekspresji w 72%, a spośród nich 73% guzów o niskim stopniu zróżnicowania wykazywało zarówno LOH jak i też hipermetylację [191].

W przypadku genu *BRCA2* nie wykryto hipermetylacji promotora jako mechanizmu inaktywacji w guzie nowotworowym. Być może inne mechanizmy molekularne są potrzebne, aby wystąpiła utrata w locus *BRCA2* i inaktywacja drugiego allele [61].

Niewiele jest doniesień literaturowych porównujących zależność pomiędzy obecnością mutacji germinalnej, a LOH markerów mikrosatelitarnych z loci genów *BRCA1* i 2. LOH z tych miejsc wydają się przeważać w rakach pochodzących od nosicieli mutacji germinalnych [10, 61, 130]. Istnieją rozbieżności dotyczące korelacji pomiędzy wykrytymi LOH w guzach, a danymi klinicznymi i histopatologicznymi. LOH 17q wydają się przeważać w gruczolakorakach surowicznych w stadium niskozróżnicowanym w stosunku do innych postaci histologicznych [141].

Wyniki prac publikowanych na powyższy temat często są oparte na badaniach niewielkiej liczby przypadków, stąd trudno o jednoznaczne ustalenie zależności pomiędzy obrazem klinicznym chorych na raka jajnika a obecnością i rodzajem mutacji i utratami materiału genetycznego.

Dlatego też w niniejszej rozprawie przeprowadzono analizę utrat wybranych markerów mikrosatelitarnych w tkance guza raka jajnika i szukano związku pomiędzy obserwowanymi zmianami molekularnymi w DNA a rodzajem histopatologicznym i stopniem złośliwości guza oraz z przebiegiem klinicznym choroby wśród nieselekcjonowanych pacjentek z rakiem jajnika. Ponadto wykonano analizę wybranych germinalnych mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*, co umożliwiło porównanie częstości LOH w dwóch grupach kobiet: z mutacją germinalną tych genów oraz bez obecności tej mutacji.

3. CELE PRACY

1. Przeprowadzenie analizy częstości występowania utraty heterozygotyczności (LOH) wybranych polimorficznych markerów mikrosatelitarnych z chromosomów 17 i 13 z uwzględnieniem loci genów *BRCA1* i *BRCA2* w nieselekcjonowanych przypadkach raka jajnika.
2. Określenie częstości występowania wybranych mutacji germinalnych genów *BRCA1* i *BRCA2* w grupie nieselekcjonowanych kobiet z rakiem jajnika.
3. 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* oraz pacjentek bez tych mutacji.

4. MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiła grupa nieselekcjonowanych 151 pacjentek z rozpoznaniem raka jajnika operowanych w Klinice Ginekologii, Instytutu Położnictwa i Chorób Kobięcych, AM w Gdańsku (Kierownik: Prof. dr hab. med. Janusz Emerich) w okresie 1992-2004. Od każdej pacjentki pobierano 10 ml krwi żyłnej oraz podczas pierwotnego zabiegu operacyjnego doświadczony operator zabezpieczał 3-4 wycinki tkanek guza jajnika, zawierające makroskopowo wyłącznie tkankę nowotworową z pierwotnego ogniska, które były natychmiast mrożone w ciekłym azocie. Do badania włączano tylko pacjentki z pewnym rozpoznaniem histopatologicznym raka jajnika oraz dwie próbki o nr 153 z rzadkim rozpoznaniem *ca omenti* oraz nr 197, gdzie u pacjentki niezależnie występował rak szyjki i trzonu macicy. W przypadkach nr 181 i nr 118 dodatkowo stwierdzono w badaniu histopatologicznym odpowiednio utkanie potworniaka oraz guz Brennera. Pacjentki podpisały pisemną zgodę na udział w badaniach genetycznych.

Do grupy badanej zostało dołączonych pięć przypadków pacjentek z rakiem jajnika i pozytywnym wynikiem w kierunku mutacji germlinalnej *BRCA1* (przedstawiono w tabeli 3), które wykryto w tym samym czasie w Pracowni Molekularnej Katedry Biologii i Genetyki AM w Gdańsku. Materiał badawczy do analizy LOH stanowiły tutaj próbki zabezpieczonego od pacjentek podczas diagnostyki mutacji DNA oraz fragmenty tkanek guza zatopione w bloczkach parafinowych pochodzące z Samodzielnej Pracowni Patomorfologii Klinicznej, Instytutu Położnictwa i Chorób Kobięcych (Kierownik: Prof. dr hab. med. Maria Hrabowska).

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

Nr przypadku	Nazwa mutacji
223	5382insC
224	185delAG
225	3376T/A
226	5382insC
227	5382insC

4.1 Dane kliniczne badanych pacjentów

Dane kliniczne otrzymano od 156 chorych. Średnia wieku pacjentek wynosiła $56 \pm 13,07$ lat. Czas życia pacjentek od momentu operacji pierwotnej do ostatniej obserwacji wynosił średnio 25 pełnych miesięcy kalendarzowych. Odnośnie zastosowanego leczenia uzupełniającego grupa pacjentek nie była jednorodna – około 20% pacjentek otrzymywało chemioterapię z użyciem taksanów, pozostałe były leczone cisplatyną. Wyniki leczenia taksanami nie odbiegały u tych pacjentek od wyników leczenia cisplatyną (dane niepublikowane). W przypadku 8 pacjentek nie udało się uaktualnić daty ostatniej obserwacji i nie mają one podanej informacji na temat dalszego przeżycia lub zgonu. W 24 przypadkach z powodu zgonu pacjentki lub braku z nią kontaktu uznano, że nie ma dość dokładnych informacji na temat wywiadu rodzinnego. Wywiad rodzinny przyjęto za pozytywny w wystąpiło w 36 przypadkach, jeżeli chora miała przynajmniej jednego krewnego I stopnia z nowotworem ze spektrum zachorowań związanych z mutacjami genów *BRCA1* lub *BRCA2*. Wyniku pomiaru poziomu CA 125 przed zabiegiem operacyjnym nie uzyskano w 12 przypadkach. Ze względu na liczebności poszczególnych rozpoznań oraz dla potrzeb analizy statystycznej wydzielono dwie grupy pacjentek: grupę 1 z rozpoznaniem *adenocarcinoma serosum* oraz grupę 2, w której znalazły się pozostałe raki. Aż 92 pacjentek miało rozpoznanie *adenocarcinoma serosum*; przeważał stopień G2 lub G3 (73); FIGO IIIC/IV (79). Pozostałe typy raka jajnika występowały rzadziej: endometroidalny-17 przypadków, śluzowy-11 przypadków, jasnokomórkowy-12, niezróżnicowane-17, płaskonabłonkowe-3 i o utkaniu mieszanym-3 przypadki. Wszystkie dane kliniczne analizowanych przypadków zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Zestawienie analizowanych podstawowych parametrów klinicznych 156 chorych z rakiem jajnika.

Nr	Wiek	Data urodzenia	Data zabiegu	Data ostatniej obserwacji	Zgon	Przeżycie*	Wywiad	CA 125	Hist pat	G	FIGO
2	64	380928	2002-02-14	2003-02-19	1	12	neg	>600	1	3	IIIC
6	45	570605	2002-02-06	2003-02-15	1	13	neg	>600	2	1	IIIC
21	58	440603	2002-03-01	2002-12-24	1	9	neg	>600	1	1	IIIC
23	42	600830	2002-03-06	2005-04-21	0	37	neg	1161	1	3	IIIC
32	74	280919	2002-03-05	2002-10-09	1	7	neg	4207	1	3	IIIC

37	55	400808	1995-12-13	1998-09-04	1	32	poz	399	1	3	IV
40	47	480426	1995-12-18	1996-07-20	1	7			1	1	IV
44	39	571023	1996-01-19	2000-09-05	1	55			1	2	IIIC
46	49	460719	1995-12-12	1996-02-16	1	2			1	3	IIIC
47	52	431028	1995-03-10	2000-12-13	1	69			1	2	IIC
49	41	550502	1996-05-15	2001-07-18	1	62	neg		1	2	IIIC
52	35	611212	1996-05-10	1996-06-13	1	1		>600	1	2	IV
53	60	350405	1995-06-26	2005-05-01	0	118	poz	395	1	3	IIIC
56	45	500324	1995-10-13	2004-05-06	1	102	poz	654	1	3	IV
58	76	190222	1995-10-11	1995-10-25	1	0	neg		1	2	IIIC
60	62	330718	1995-11-13	1997-05-01	1	17	poz		1	2	IIIC
63	60	350605	1995-06-28	1998-02-27	1	20		14	1	1	IC
65	64	310929	1995-06-27	1997-02-24	1	19	poz	>600	1	2	IIIC
66	63	320531	1995-04-12	1995-10-27	1	6			1	3	IV
68	71	240930	1995-03-24	1997-04-12	1	24	neg		1	3	IV
69	47	470817	1993-09-01	1994-12-29	1	15			2	2	IA
72	45	510128	1996-09-09	1998-03-17	1	18		>600	1	3	IIIB
73	44	510406	1995-03-31	2001-05-11	1	73		14	1	2	IIIC
74	45	500430	1995-02-21	1996-09-29	1	19	poz		1	2	IA
76	52	401030	1992-12-03	1995-01-19	1	25			1	3	IIIC
77	59	3390808	1992-11-23	2005-05-01	0	149			2	1	IA
82	64	310703	1995-03-02	1998-10-04	1	43			1	2	IV
84	56	380521	1994-12-20	2005-05-13	0	124	poz		1	2	IA
85	73	201214	1993-09-15	1993-09-24	1	0	neg	>500	2	3	IIIC
90	60	421126	2002-04-09	2002-11-26	1	7	poz	127	2	2	IIIB
92	43	520914	1995-11-22	1999-05-19	1	41	poz	>600	1	2	IV
93	76	191109	1995-02-21	1996-10-09	1	19		319	1	3	IIIC
94	86	100713	1996-01-02	1997-04-03	1	15			2	3	IIIC
95	44	510718	1995-12-12	1999-03-29	1	39			1	2	IIIC
96	55	401019	1995-12-13	1995-12-26	1	0		344	1	2	IV
97	72	250325	1997-01-24	1997-10-03	1	8	neg	3091	1	2	IIIC
99	37	581121	1995-04-05	1995-05-15	1	1	neg	88	1	3	IV
100	45	500602	1995-11-16	2000-03-02	1	51	poz	480	1	2	IIIC
102	32	640612	1996-04-15	2005-05-01	0	108		326	2	3	IIIC
104	67	290811	1996-04-30	1997-02-10	1	9	neg		1	2	IV
108	41	610202	2002-04-24	2003-03-14	1	10	neg	647	2	1	IIIC
110	79	230829	2002-05-20	2003-03-21	1	10	poz	105	1	2	IIIC
111	72	300402	2002-04-30	2003-12-12	1	19	neg	135	2	2	IIIC
112	32	701221	2002-04-18	2004-11-15	1	30	poz	216	1	3	IIIB
113	48	470602	1995-04-10	2000-10-20	1	66	poz	642	1	3	IIIC
115	58	441128	2002-01-10	2002-08-22		7	neg	1885	2	3	IIIC
118	79	230804	2002-12-16	2005-04-21	0	28	neg		2	3	IIIC
120	52	471009	1999-10-15	2004-04-11	1	77	neg		2	?	IIIC
121	52	500514	2002-11-20	2005-05-01	0	29		>600	2	3	IIC
122	51	510602	2002-10-21	2005-04-26	0	30	neg	182	2	1	IC
124	47	541116	2001-09-26	2004-02-12		28	neg		1	?	?
125	50	460923	1996-06-15	2005-04-26	0	106	neg		2	3	IIIC
126	60	420703	2002-12-05	2002-12-23	1	0	poz	232	2	1	IIIC
127	47	550621	2002-08-05	2005-04-26	0	32	neg	198	2	3	IIIB
128	54	491125	2003-03-11	2005-02-13	0	23	neg		1	3	IIIC
129	74	280223	2002-07-31	2005-04-25	1	32	neg	508	1	2	IIIC
131	75	270401	2002-08-12	2003-08-08	1	12	neg	534	1	3	IIIC
132	71	311004	2002-08-01	2004-05-01	1	21	neg	3098	2	3	IIIC
133	51	480407	1999-06-01	2003-04-01	1	46	neg	10	1	1	IIIC

134	56	470922	2003-02-11	2005-04-26	0	26	neg		1	3	IIIC
135	55	480413	2003-02-28	2004-07-19	1	16	neg	>600	1	1	IIIC
136	74	291010	2003-02-03	2005-05-17	0	27	neg	298	1	2	IIIC
137	62	400404	2002-12-12	2004-05-30	1	17	neg		1	1	IIIC
138	68	350928	2003-02-17	2005-05-23	0	27	neg		2	2	IIIA
139	56	461004	2002-12-04	2003-09-19	1	9	neg	63,4	2	1	IIIC
141	73	300204	2003-02-19	2005-04-26	0	26	neg		1	3	I
144	20	820626	2002-10-23	2003-07-27	1	9	neg		2	2	IB
145	53	491030	2002-10-29	2005-04-26	0	29	neg	225	1	3	IIIC
150	56	470407	2003-01-21	2003-01-27	1	0		403	2	3	IIIC
152	66	361221	2002-07-19	2005-04-26	0	33	poz	2521	1	2	IIIC
153	54	491215	2003-01-27	2004-05-01	1	15	poz		1	?	IV
155	51	530716	2001-07-15	2004-05-14	1	34	neg	106	2	2	IIIC
157	37	641102	2001-05-23	2003-02-21	1	20	neg	>600	1	2	IIIC
158	40	620413	2002-10-08	2005-05-16	0	31	neg	3328	2	3	IC
159	76	250126	2001-08-20	2002-09-28	1	13	neg	>600	1	2	IIIC
160	51	510322	2002-03-06	2003-05-14		14		579	1	1	IIIC/B
161	41	621112	2003-01-03	2005-05-23	0	28	neg	472	2	3	IIIB
165	58	440101	2002-10-21	2004-01-01	1	14	neg	10	1	2	IIIC
166	53	500713	2003-01-16	2005-04-26	0	27	neg		2	3	IIIC
167	77	250404	2002-09-10	2002-09-27	1	0	neg		1	1	IIIC
169	48	550530	2003-04-02	2005-05-19	0	24	neg	255	2	2	IIC
170	78	250428	2003-04-09	2004-09-30	1	17	poz		1	1	IIIC
171	82	210901	2003-03-26	2003-05-05		1	poz		2	2	IIIC
172	55	481218	2003-03-17	2005-05-19	0	26	neg	1001	1	2	IIIC
173	58	450201	2003-04-17	2005-06-02	0	13	neg	227	2	2	IC
175	62	400208	2002-07-16	2003-04-14		9	neg		1	?	IIIC
176	61	370726	1998-01-05	2003-06-23	1	65	neg		2	?	IA
177	47	561210	2003-06-11	2005-05-20	0	23	neg	874	2	2	IIIB
179	66	370524	2003-05-26	2005-06-03	0	23	neg	1070	2	3	IV
180	41	621114	2003-05-08	2005-05-19	0	24	neg	94	2	1	IC
181	51	520202	2003-06-16	2005-05-19	0	23	neg	>600	2	1	IB
182	73	300220	2003-05-09	2005-05-19	0	24	neg	563	2	3	IV
183	56	470529	2003-06-18	2004-11-28	1	17	poz	1172	1	3	IV
184	65	380305	2003-06-24	2003-06-30	1	0		474	2	3	IIIC
185	46	571204	2003-05-28	2003-06-29	1	1	neg		2	1	IV
186	65	380917	2003-06-11	2005-05-23	0	23	neg	20,5	2	3	IA
187	46	570319	2003-06-02	2005-05-20	0	23	neg	960	1	2	IIIC
189	62	410107	2003-09-23	2005-05-20	0	19	neg	1467	2	3	IIIC
190	54	491218	2003-09-08	2005-05-19	0	20	neg	198	2	3	IIB
191	48	550306	2003-09-10		1		neg	>600	1	2	IIIC
192	67	360729	2003-10-26	2005-05-23	0	18	neg	927	1	3	IV
194	67	360618	2003-10-26	2005-05-19	0	18	neg	26,4	1	3	IIIB
195	54	490728	2003-10-01	2005-05-23	0	19	neg	1760	1	2	IIB
196	35	680306	2003-09-29	2005-05-23	0	19	poz		1	3	IIIC
197	53	501026	2003-09-01	2005-05-23	0	20	neg	55	2	1	IIIC
198	72	311022	2003-05-08	2005-05-01	0	23	neg		2	3	IIIC
199	46	570925	2003-05-23	2005-05-23	0	24	neg		2	2	IIIC
200	73	301221	2003-09-15	2004-04-23	1	7	neg	4851	1	3	IV
201	52	511123	2003-05-24	2005-06-07	0	24	poz	8257	2	3	IV
203	55	481113	2003-02-10	2004-02-01	1	11	neg		2	1	IIIC
204	27	760822	2003-12-17	2004-10-01	1	9	poz		1	2	IV
205	52	510810	2003-12-17	2005-05-23	0	17	neg	3296	2	3	IIIC
206	71	320920	2003-12-15	2005-05-20	0	17	neg	4064	1	2	IIIB

208	62	420412	2004-01-07	2004-01-13		0	neg		1	2	IIIB
209	74	290615	2003-01-15	2003-12-01		10	neg	34	2	1	IIIC
211	82	211209	2003-10-15	2005-05-01	0	18	poz	802	1	2	IIIA
212	54	490807	2003-08-27	2005-05-20	0	20	poz	492	1	2	IIIC
213	74	290224	2003-09-15	2005-05-23	0	20	neg		1	3	IIIC
214	67	360313	2003-10-14	2004-05-25	1	7	neg	3157	1	?	IV
215	56	470214	2003-08-26	2005-05-19	0	20	poz		1	2	IIC
216	57	460501	2003-10-13	2005-05-20	0	18	neg	2235	1	3	IIIC
217	59	440611	2003-10-08	2005-02-10	1	16	poz		1	2	IIIC
218	88	160408	2004-01-14	2005-06-03	0	16	neg		1	1	IV
219	54	500221	2004-01-05	2005-05-15	0	16	neg	311		3	IIIC
220	63	410306	2004-01-13	2005-05-15	0	16	neg	498	2	2	IIIC
221	51	520321	2003-03-13	2004-11-01	1	19	neg	760	1	2	IIIC
222	48	560206	2004-01-19	2005-06-06	0	16	poz	95	2	3	IIB
223	47	530804	2000-08-11	2001-07-03	1	10	poz	683	2	3	IIIC
224	51	501003	1995-06-23	2003-01-13	0	90			2	3	IC
225	49	481012	1997-08-01	2004-03-03	0	84	poz	83,7	1	2	
226	49	490319	1998-11-15	2003-01-02	1	49	poz		1	2	IV
227	40	540701	1998-01-05	2002-01-07	1	48	poz		1		
228	51	530108	2004-03-24	2005-06-01	0	14	neg	526	1	2	IIIC
229	45	590219	2004-04-29	2005-06-01	0	13	neg	>600	2	3	IA
230	44	600528	2004-05-26	2005-06-01	0	12	neg	835	2	2	IC
231	67	371029	2004-05-24	2005-06-01	1	12	neg	169	1	3	IIIC
232	47	570411	2004-05-26	2005-06-01	0	12	neg	8749	1	3	IV
233	72	320324	2004-01-12	2005-06-01	1	16	neg		2	2	IIIC
234	45	580904	2003-12-30	2005-06-01	1	17	neg	85	2		
235	67	371222	2004-01-12	2005-06-01	0	16	neg	311	2	1	IA
237	73	310228	2004-05-25	2005-06-01	0	12	poz	3967	1	2	IIC
238	68	361211	2004-07-14	2005-06-01	0	10	neg	>600	2	2	IIC
243	58	460703	2004-02-05	2005-06-01	0	15	neg	138	1	1	IIIC
245	52	521028	2004-01-06	2005-06-01	0	17	neg	2020	2	3	IB
249	58	450226	2003-11-27	2005-06-01	0	18	neg	134	1	1	IIIB
251	67	361224	2003-11-13	2005-06-01	0	18	neg	119	1	1	IV
253	58	460122	2004-01-26	2005-06-01	0	16	neg	319	2	2	IIC
254	72	320906	2004-03-11	2005-06-01	0	14	neg	1636	2	3	IV
255	78	260101	2004-03-15	2005-06-01	0	14	poz	486	1	2	IV
256	42	621025	2004-03-16	2005-06-01	0	14	poz	>600	2	3	IIIA
257	63	411201	2004-02-17	2005-06-01	0	15	neg	300	1	2	IIIC
708	45	561022	2001-10-30	2005-05-01	0	42	poz	94	2	2	IC
709	24	771208	2001-09-26	2003-07-27	1	22	neg	2600	1	2	IIIC
766	46	540831	2000-04-26	2003-11-16	1	42	poz	156	2	3	IC
790	65	360418	2001-03-28	2005-05-01	0	49		3218	1	1	IIB
792	37	651212	2002-03-05	2003-09-11		18	neg	136	1	3	IIB

* pełne miesiące kalendarzowe;

neg-negatywny wywiad rodzinny, poz-pozytywny wywiad rodzinny;

CA 125 podano w jednostkach U/ml;

zgon 1 – nastąpił zgon pacjentki, zgon 0 – dalsze przeżycie pacjentki;

Data urodzenia pacjentki została podana jako pierwszych sześć cyfr nr PESEL.

5. METODY

5.1 Aparatura

• Sekwencjator automatyczny ABI PRISM310	Applied Biosystem
• Termocykler GeneAmp PCR System 2400	
• Termocykler GeneAmp PCR System 2700	
• System archiwizacji żeli Gel Doc 2000 z oprogramowaniem Quantity One	Bio-Rad
• Zasilacz PowerPac 3000	
• Wirówka 5810R	Eppendorff
• Wirówka 5804	
• Wirówka MiniSpin	
• Termomikser comfort	
• Termocykler Mastercycler personal 96 x 0,2 mL	
• Worteks	Ika
• Zamrażarka -80°C	Juan
• Wirówka próżniowa	Labonco
• Cieplarka	Laborgerate Berlin
• Termocykler PTC-200 DNA Engine	MJ-Research
• Spektrofotometr Helios Gamma UV/Vis	SpectroLab
• Zestaw DHPLC - System WAVE 3500	Transgenomic Ltd

5.2 Odczynniki

• Zestaw Exterminator (250)	A&A Biotechnology
• Zestaw Clean-up (250)	
• 10x EDTA bufor	Applied Biosystem
• 2,5x Sequencing Buffer	
• BigDye Terminator Kit wersja 3.1	
• GeneScan-350 TAMRA	
• Kapilara 47cm x 50µm	
• Polimer POP-4	
• Polimer POP-6	
• 30% akrylamid/bis (37,5:1)	Bio-Rad
• Marker wielkości M1	DNA Gdańsk II
• Marker wielkości M100-500	
• Perpetual Opti Taq Polimeraza DNA	EUR-x
• 10 x AmpliBuffer B	
• roztwór 25mM MgCl ₂	
• Fenol, roztw. nasycony, pH 6.6, z buforem do kalibracji	ICN
• Ksylen	
• Proteinaza K	

<ul style="list-style-type: none"> • Taq Polimeraza DNA (rekombinowana) • 10 x Buffer • roztwór 25mM MgCl₂ • enzym restrykcyjny Eco471 • bufor R do enzymu • Agaroza PRONA Basic LE 	MBI, Fermentas
<ul style="list-style-type: none"> • Ion Exchanger Amberlite® MB-3 • Chloroform • Izopropanol 	Merck
<ul style="list-style-type: none"> • Alkohol etylowy 96° 	POCH Gliwice
<ul style="list-style-type: none"> • Startery 	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Warszawa
<ul style="list-style-type: none"> • dNTPs zestaw 40 μM 	Promega
<ul style="list-style-type: none"> • Bromek etydyny • Chlorek amonu • EDTA • TRIS BASE • Octan sodu • Proteinaza K • Kwas borowy • Sacharoza • Xylene cyanol • Bromofenol blue • Chlorek sodu • Wodorowęglan Potasu • Formamid • SDS 	Sigma
<ul style="list-style-type: none"> • Zestaw WAVE Optimized Buffers 	Transgenomic Ltd

5.3 Roztwory

<ul style="list-style-type: none"> • Bufor 5xRBC (500 ml) 	NH ₄ Cl 20,73 g KHCO ₃ 2,3 g 0,5 M EDTA, pH 8.0, 10 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Bufor do proteiny K 	100 mM NaCl 10 mM Tris HCl, pH 8.0 25 mM EDTA, pH 8.0 0.5% SDS
<ul style="list-style-type: none"> • Roztwór roboczy proteiny K 	50 mg/ml oraz 20mg/ml
<ul style="list-style-type: none"> • 6x bufor obciążający (50 ml) 	0,25% bromofenol blue 0,25% xylene cyanol 40% sacharoza
<ul style="list-style-type: none"> • 5xTBE (1000 ml) 	54 g Tris

	27,5 g kwas borowy 0,5 M EDTA, pH 8.0, 20 ml
• 50x TEA (1000 ml)	242 g Tris 57,1 ml kwasu octowego lodowatego 0,5 M EDTA, pH 8.0, 100 ml
• Roztwór roboczy bromku etydyny (200ml)	bromek etydyny (10 mg/ml) 20µl 1x TEA
• Roztwór roboczy akrylamidu (100 ml)	50x TEA 1,9 ml 30% akrylamid/bis (37,5:1), 23,5 ml

5.4 Izolacja materiału genetycznego

5.4.1 Izolacja z pełnej krwi obwodowej

Świeżą krew żylną pobraną do 10 ml próbek zawierających EDTA wirowano wstępnie przez 10 minut (+4°C, 1811 x g). Następnie odciągano osocze, a odwirowany osad leukocytów wraz z innymi elementami morfotycznymi krwi na dnie próbki zalewano 10 ml buforu 1x RBC. Probówkę chłodzono w lodzie przez 10 minut. Następnie 3-4 krotnie wirowano probówkę (10 minut, +4°C, 3220 x g), zlewano supernatant i pozostawiony osad leukocytów przepłukiwano 5 ml buforu 1x RBC, aż do uzyskania białego osadu. Do osadu dodawano buforu do proteiny, silnie wstrząsano i po dodaniu 12 µL proteiny K 20mg/ml inkubowano przez noc w 37°C.

Do strawionego materiału dodawano 3 mL fenolu (pH 7.9) i wytrząsano przez 15-20 min., po czym wirowano (15 minut, +4°C, 3220 x g). Górną warstwę przenoszono do nowej próbki i zalewano 5 ml chloroformu, ponownie wytrząsano i wirowano (10 minut, +4°C, 6300 x g). Czynność tę powtarzano 2-3 krotnie. Następnie do przeniesionej górnej warstwy do nowej próbki dodawano 5 ml izopropanolu i odstawiano do -20°C na co najmniej 30 minut. Probówki delikatnie wytrząsano, aż do wytrącenia się kłaczków DNA. DNA przenoszono do Eppendorfa 1,5 ml z 70° etanolem i wirowano (10 minut, +4°C, 20817 x g), zbierano supernatant pipetą a osad suszono w wirówce próżniowej około 20-30 minut. Uzyskany osad DNA rozpuszczano w odpowiedniej ilości sterylnej, podwójnie destylowanej wody (150-300 µl). Po rozpuszczeniu się osadu, próbkę

wyjściową rozcieńczano do stężenia 30ng/μl po uprzedniej ocenie ilości DNA w pomiarze spektrofotometrycznym.

5.4.2 Izolacja ze świeżo mrożonych fragmentów guzów nowotworowych

Z zamrożonego wycinka tkanki guza (-80°C) odcinano skalpelem fragment wielkości 5 x 5 mm i po rozfragmentowaniu przenoszono do probówki zawierającej bufor do proteinyzy, silnie wstrząsano i po dodaniu 20 μL proteinyzy K 50 mg/ml inkubowano w 37°C przez noc. Następnie przenoszono probówki z trawiącą się zawiesiną na 60 min. do 56°C i inaktywowano proteinyzę K umieszczając probówkę w temp. 72°C przez okres 5 minut.

Strawiony materiał poddawano ekstrakcji fenolem i chloroformem oraz precypitacji etanolem zgodnie z podanym powyżej protokołem aż do uzyskania osadu DNA, który po wysuszeniu rozpuszczano w odpowiedniej ilości sterylnej, podwójnie destylowanej wody (150-300 μl). Podobnie jak DNA pochodzące z krwi pacjentki, próbkę wyjściową DNA z guza, rozcieńczano do stężenia 30ng/μl wg pomiaru spektrofotometrycznego.

5.4.3 Izolacja z fragmentów tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie

Na podstawie obrazu histologicznego preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną wybierano z bloku parafinowego fragment zawierający tkankę nowotworową i skrawano na 20-30 skrawków o grubości 5μm. W celu ich odparafinowania płukano je dwukrotnie w 700μl ksylenu. Zawiesinę fragmentów tkanki wirowano (15 minut, 20°C, 20817 x g) usuwano warstwę ksylenu, osad przemywano dwukrotnie etanolem i ponownie wirowano (15 minut, 20817 x g). Etanol usuwano, a odwodnioną tkankę liofilizowano przez 25 minut. Do uzyskanego osadu dodawano 300μl buforu do proteinyzy K oraz 5-10μl roztworu proteinyzy K 50mg/mL i inkubowano 4-7 dni w temperaturze 45°C, codziennie wortexując.

Do strawionego materiału dodawano 500μl fenolu wytrząsano przez 10-15 minut i wirowano (15 minut, 20°C, 20817 x g). Górną warstwę zbierano do nowej probówki i dodawano 500μl chloroformu, ponownie wytrząsano i wirowano. Warstwę wodną (górną) przenoszono do nowej probówki i

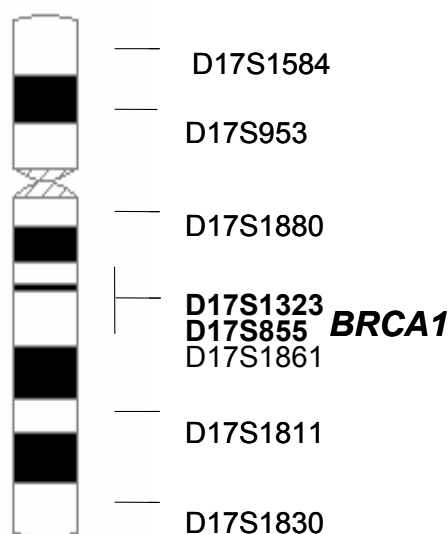
dodawano ok. 1ml etanolu 96° (2-3 objętości). Probówki umieszczano w temp. -20°C na noc.

Probówki ze strąconym DNA wirowano (30 minut, 4°C, 20817 x g), zbierano supernatant pipetą, a osad suszono pod wyciągiem przez ok. 30 minut. DNA rozpuszczano w odpowiedniej ilości wody (50-100µl). Również te próbki rozcieńczano do stężenia 30 ng/µl.

5.5 Technika LOH

5.5.1 Polimorficzne markery z chromosomu 17

Badanie utraty heterozygotyczności rozpoczęto z użyciem ośmiu wysoce polimorficznych markerów mikrosatelitarnych (dwunukleotydowe powtórzenia VNTR). Lokalizację wybranych markerów przedstawiono na ryc.3



Rycina 3. Lokalizacja ośmiu markerów mikrosatelitarnych z chromosomu 17. Markery zlokalizowane w intronach genu *BRCA1* oznaczono boldem.

Wybrano markery obejmujące 17p i q ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji genu *BRCA1*. Dla locus genu *BRCA1* markery D17S1323 i D17S855 są położone wewnątrzgenowo (odpowiednio intron 12 i 20), a D17S1880, D17S1861 są markerami flankującymi. Ponadto markery zostały dobrane ze względu na wysoką heterozygotyczność, wynoszącą \geq

0,75, z wyjątkiem D17S1323 (0,49), który jest markerem zlokalizowanym w intronie 12 genu *BRCA1*. Oznacza to, że częstość występowania heterozygot w populacji dla siedmiu markerów oprócz D17S1323 wynosi > 75%. Na doborze badanych sekwencji zaważyła również ich długość - w celu uzyskiwania wysokiego poziomu amplifikacji wybierano markery o długości poniżej 200 par zasad. Umieszczenie badanych markerów na chromosomie 17 ustalono na podstawie baz danych z *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), gdzie w opcji Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/) możliwe jest sprawdzenie lokalizacji markerów mikrosatelitarnych w bazie zbiorczej dla markerów mikrosatelitarnych STS jak również w wybranych: GDB i Marshfield [181, 112].

Startery zostały zsyntetyzowane na podstawie sekwencji zawartych w NCBI (wg wersji z dnia 26-04-2002). W każdej parze starter sensowny (F) został zmodyfikowany na końcu 5' jednym z trzech znaczników fluorescencyjnych (6-FAM, TET, HEX), dzięki czemu możliwa była identyfikacja produktu PCR poprzez wzbudzenie światłem lasera w sekwenatorze automatycznym (tab. 5).

Tabela 5. Markery mikrosatelitarne z chromosomu 17, wykorzystane do badań LOH

Marker wg NCBI	Region chromosomalny	(kb)Lokalizacja	Sekwencje starterów	tycznośćHeterozygo	Długość (bp)	Temp. przyłączenia (°C)
D17S1584	17p13	4292	F-AGCTGCTTCTGCAAAAGATG	0,84	94-124	54
			R-TACAAAGTCCTGGGCCAC			
D17S953	17p11	16043	F-ACTATCCGGCCCAATACA	0,75	119-131	58,8
			R-AAGGGCTTGCTTTTGAC			
D17S1880	17q11.2	28038	F-AGGGATTGCTTGAGCC	0,83	154-196	56
			R-TGACAGAAATTTGAACACTTTG			
D17S1323	17q21 - BRCA1, intron 12	38492	F-TAGGAGATGGATTATTGGTG	0,49	155	54
			R-AAGCAACTTTGCAATGAGTG			
D17S855	17q21 - BRCA1, intron 20	38458	F-GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG	0,82	143	54
			R-ACACAGACTTGTCTACTGCC			
D17S1861	17q21	40163	F-AGGGGCAGCAGTCCTGTA	0,82	94-116	54
			R-ACATCATCCTGAAATCTAATGGG			
D17S1811	17q23	57565	F-GGAGCGCCACACTAATTTTT	0,78	88-102	56
			R-GGCATGAGCCACCCTTAACATA			
D17S1830	17q25	116,86 cM *	F-GGAGACTCCATCTCAAAA	0,79	90-122	54
			R-ATTTGCCCATCTGCTTT			

*marker D17S1830 z bazy Marshfield [112].

5.5.2 Polimorficzne markery z chromosomu 13

Badanie utraty heterozygotyczności przeprowadzono z użyciem siedmiu wysoce polimorficznych markerów mikrosatelitarnych (Ryc. 4)



Rycina 4. Lokalizacja siedmiu markerów mikrosatelitarnych z chromosomu 13.

Sekwencje starterów oraz dane o ich lokalizacji, jak również temperatury przyłączania w reakcji PCR zestawiono w tab. 6.

Wybrano markery rozmieszczone wzdłuż chromosomu 13q ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji genu *BRCA2*. Najbliżej genu *BRCA2* znajdowały się markery D13S260 i D13S171. Ponownie, dwunukleotydowe markery zostały dobrane ze względu na wysoką heterozygotyczność, wynoszącą powyżej 0,69 oraz na długość amplifikowanej sekwencji (poniżej 250 par zasad). Ich lokalizacja była dobrana w taki sposób, aby objąć badaniem całe ramiona q akrocentrycznego chromosomu 13 i nie pominąć w analizie występowania LOH dużych delecji materiału genetycznego.

Tabela 6. Markery mikrosatelitarne z chromosomu 13, wykorzystane do badań LOH

Marker wg NCBI	Region chromosomalny	(kb)Lokalizacja	Sekwencje starterów	Heterozygotyczność	Długość (bp)	Temp. przyłączania (°C)
D13S175	13q11	19747	F-TATTGGATACTTGAATCTGCTG	0,77	101-113	54
			R-TGCATCACCTCACATAGGTTA			
D13S1246	13q12	30004	F-GAGCATGTGTGACTTTCATATTCAG	0,82	177-213	54
			R-AGTGGCTATTCATTGCTACAGG			
D13S260	13q13.1	31335	F-AGATATTGTCTCCGTTCCCATGA	0,78	158-173	54
			R-CCCAGATATAAGGACCCTGGCTA			
D13S171	13q13.1	32152	F-CCTACCATTGACACTCTCAG	0,72	227-241	48
			R-TAGGGCCATCCATTCT			
D13S267	13q13.2	33162	F-GGCCTGAAAGGTATCCTC	0,69	148-162	58
			R-TCCCACCATAAGCACAAG			
D13S264	13q31	80090	F-TGGCAAAATAACTGCTCTGG	0,72	103-117	54
			R-TGAAGTTTTGTTGGGATAATGTAA			
D13S285	13q34	111843	F-ATATATGCACATCCCATG	0,81	92-106	54
			R-GGCCAAAGATAGATAGCAAAGTA			

Startery zostały zsyntetyzowane na podstawie danych zawartych w NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview - wersja z dnia 26-04-2002). Podobnie jak w poprzedniej grupie starter sensory (F) każdej pary został zmodyfikowany na końcu 5' jednym z trzech znaczników fluorescencyjnych (6-FAM, TET, HEX) (tab. 6).

5.5.3 Polimorficzne markery z chromosomów 15 i 16

Aby sprawdzić, czy zjawisko LOH jest ograniczone w badanej grupie do chromosomów 13 i 17, w ostatnim roku pracy został zanalizowany dodatkowy zestaw czterech wysoce polimorficznych markerów z chromosomów 15 i 16 (ryc. 5, tab. 7). Dla stwierdzenia, czy utraty alleliczne są faktycznie częste dla chromosomów 13 i 17 dobrano markery z ramion p i q chromosomów korespondujących wielkością z chromosomami 13 i 17.

W miejscu lokalizacji tych markerów nie opisywano obecności genów powiązanych z predyspozycją do dziedzicznych postaci nowotworów.



Rycina 5. Markery mikrosatelitarne z chromosomów 15 i 16.

Tabela 7. Markery z chromosomów 15 i 16, wykorzystane do badania porównawczego LOH

Marker wg NCBI	Region chromosomalny	Lokalizacja (kb)	Sekwencje starterów	tycznośćHeterozygo	Długość (bp)	Temp. przyłączenia (°C)
D15S97	15q11.1	24383	F-CTTCTAGCCTCAGGTTCCCC	0,75	159	54
			R-ATTCACCTTTTCAAACCCACCCC			
D15S205	15q25	82022	F-CTTAATGGTTTGGCAGGATA	0,88	128-170	54
			F-AGCTTAAANCAAAAATCTCCC			
D16S403	16p12	22945	F-GTTTTCTCCCTGGGACATTT	0,85	134-155	54
			R-TATTCATTTGTGTGGCATG			
D16S3089	16q21	59067	F-TGTGGTATTTTCAAATTAACCTG	0,88	174-200	54
			R-AGTACGCTTCGTTTGTTC			

5.5.4 Amplifikacja markerów techniką PCR

Reakcję PCR przeprowadzano w objętości 15 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała ok. 45 ng genomowego DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Skład mieszaniny do amplifikacji markerów LOH

Składnik mieszaniny:	objętość / próbkę [μ l]
10x bufor	1,5
MgCl ₂ [25mM]	1,5
dNTP mix [5 mM]	0,5
Mieszanina starterów [5 μ M]	1,0
Polimeraza Taq [5U/ μ l]	0,08
Woda	8,92
DNA [30 ng/ μ l]	1,5

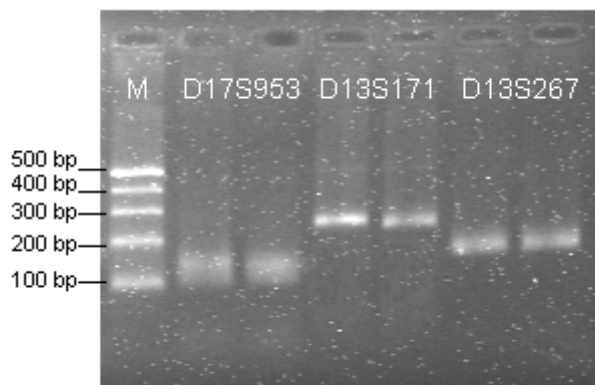
W każdej reakcji PCR wykonywano kontrolę pozytywną – amplifikowano DNA o znanej jakości. Jako kontrolę negatywną reakcji stosowano próbkę, gdzie zamiast DNA dodano analogiczną objętość wody destylowanej.

Warunki reakcji ustalono osobno dla każdej pary wykorzystywanych starterów. Ogólne warunki reakcji PCR przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Warunki amplifikacji markerów LOH

Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
94°C	5'	1
94°C	30"	30
48-58°C	1'	
72°C	2'	
72°C	7'	1
4°C	∞	

Produkt PCR rozdzielano wstępnie na 2% żelu agarozowym, w 0,5x TBE, aby potwierdzić obecność zamplifikowanego fragmentu (ryc. 6).



Rycina 6. Przykładowy żel agarozowy, wybarwiony bromkiem etydyny. Zamplifikowano markery D17S953, D13S171 i D13S267 w dwóch wybranych przypadkach; M-marker wielkości.

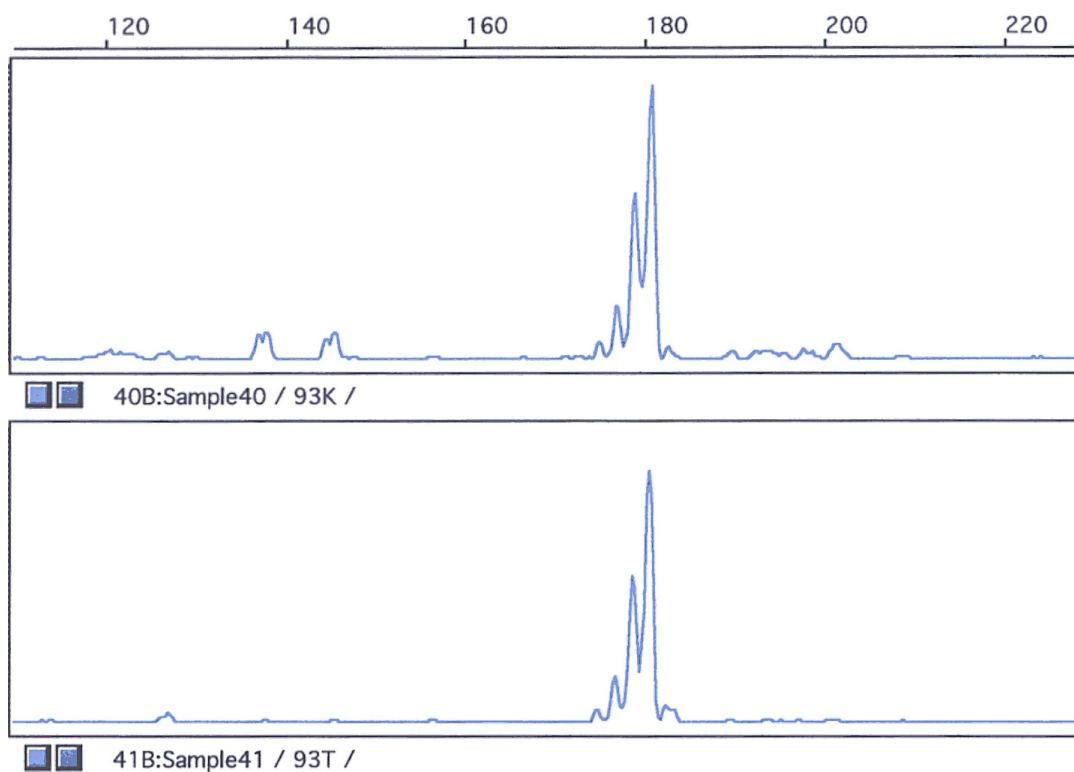
5.5.5 Analiza amplifikowanych fragmentów

Do analizy mieszano po 1 μ l produktu znakowanego FAM i TET oraz 2 μ l produktu znakowanego HEX (1FAM:1TET:2HEX) i dodawano dejonizowany formamid do końcowej objętości 12 μ l oraz 0,5 μ l markera wielkości GeneScan-350, znakowanego TAMRA. Tak przygotowaną próbkę denaturowano przy użyciu termomiksera w temperaturze 95°C przez 2 minuty i natychmiast chłodzono na lodzie. Następnie próbki analizowano w automatycznym sekwenatorze ABI 310, prowadząc elektroferezę w temperaturze 60°C, przy natężeniu prądu poniżej 8 μ A. Rozdział przeprowadzano standardowo przez 24 minuty, przy napięciu prądu 15kV.

Intensywność fluorescencji była odczytywana z użyciem filtra C i zapisywana przy użyciu programu komputerowego ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0, a zebrane dane były analizowane przy pomocy programu ABI PRISM GeneScan Analysis Program v 3.1.

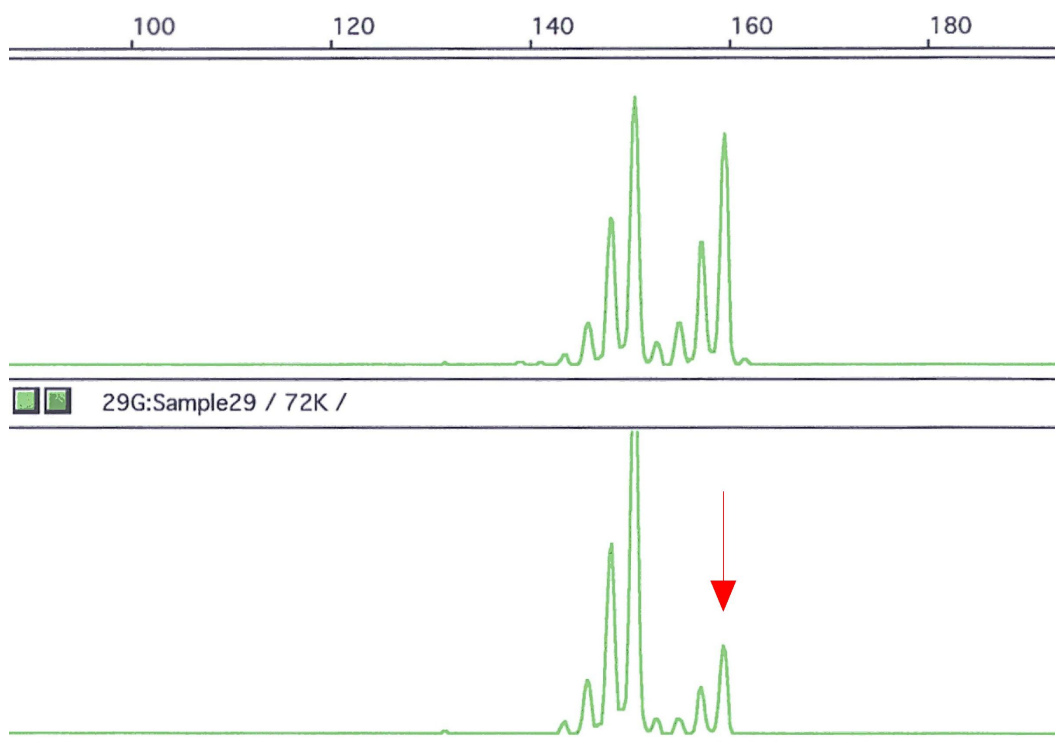
5.5.6 Ocena utraty heterozygotyczności (LOH)

Podczas analizy wyników porównywano piki sygnałów pochodzące z DNA prawidłowego (K - pochodzące z tkanki prawidłowej - krwi), z sygnałami z DNA wyizolowanego z guza (T). Przypadek uznawano za nieinformacyjny (homozygotyczny), jeśli w próbce z DNA z tkanki nienowotworowej widoczny był pojedynczy pik fluorescencji (Ryc. 7).



Rycina 7. Przykładowy elektroforogram ukazujący analizę LOH markera D17S1880 w próbce nr 93. Przypadek nieinformacyjny – zarówno w DNA pochodzącym z krwi obwodowej jak również w DNA z guza uzyskano pojedynczy pik.

Jeżeli na elektroforogramie ze zdrowej tkanki widoczne były dwa podstawowe piki, uznawano przypadek za heterozygotyczny w stosunku do danego markera (ryc. 8).



Rycina 8. Na powyższym przykładzie analizy markera D13S267 widoczne są dwa piki (allele) zarówno w DNA konstytutywnym (u góry) jak i też w DNA z guza nr 72. W DNA z guza jest widoczna utrata heterozygotyczności (obniżenie wysokości piku wskazane strzałką).

Ocena LOH była oparta na matematycznie obliczonym stosunku wysokości pików w elektroforogramie z poszczególnych alleli w danym locus w tkance prawidłowej (N) i tkance nowotworowej (T), pochodzących od tej samej chorej. Wykorzystywano wzór $(N1T2)/(N2T1)$, gdzie N1 i N2 są wartościami wysokości sygnałów pochodzących od dwóch alleli w tkance prawidłowej, a T1 i T2 – w tkance nowotworowej. Jeśli wynik obliczeń był $>1,0$, stosowano równanie $1/(N1T2)(N2T1)$. Przyjęto, że wynik w granicach 1,0 - 0,7 oznacza zachowanie heterozygotyczności, natomiast wynik poniżej 0,7 uznano za świadczący o utracie heterozygotyczności.

5.6 Badanie mutacji

5.6.1 Najczęstsze mutacje w genie *BRCA1*

Na podstawie danych literaturowych przedstawionych we wstępie wybrano pięć najczęstszych mutacji występujących w populacji polskiej. Wybrane eksony 2, 5, 20 oraz fragment 11-12 i 11-13 eksonu 11 były amplifikowane w reakcji PCR, z zastosowaniem starterów zaprojektowanych w Katedrze Biologii i Genetyki AM w Gdańsku, na podstawie sekwencji *BRCA1* opublikowanej w bazie Ensemble (<http://www.ensembl.org>, nr.: ENST00000337272). Wybrane mutacje wraz z ich lokalizacją i rodzajem zmiany przedstawiono w tab. 10.

Tabela 10. Pięć podstawowych badanych mutacji genu *BRCA1*.

Nazwa mutacji	Ekson	Zmiana nukleotydu	Zmiana aa*	Typ mutacji
185delAG	2	del AG	Stop 39	F
300T/G (C61G)	5	T na G	Cys na Gly	M
3819del5	11	del GTAAA	Stop 1242	F
4154delA	11	del A	Stop 1345	F
5382insC	20	ins C	Stop 1829	F

*zmiana aminokwasu; F-mutacja przesunięcia ramki odczytu; M-mutacja zmiany sensu

Reakcję PCR przeprowadzano w objętości 27 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała ok. 60 ng genomowego DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tab. 11.

Tabela 11. Skład mieszaniny do amplifikacji wybranych mutacji genu *BRCA 1*

Składnik mieszaniny:	objętość / próbkę [μ l]
bufor do PCR, 10x	2,5
MgCl ₂ [25mM]	2,5
dNTP mix [5mM]	0,5
Starter F [10 μ M]	0,5
Starter R [10 μ M]	0,5
Woda	18,38
Taq Polimeraza [5U/ μ l]	0,12
DNA	2

Do każdej reakcji PCR dołączano jako badanie kontrolne pozytywne DNA o potwierdzonej sekwencjonowaniem mutacji. Jako badanie kontrolne

negatywne reakcji stosowano próbkę, gdzie zamiast DNA dodano analogiczną objętość wody. Do amplifikacji części wybranych fragmentów genu *BRCA1* jak również wymienionych później 13 fragmentów eksonu 11 genu *BRCA1* oraz eksonu 10 i 11 (24 fragmenty) genu *BRCA2* wykorzystywano specjalnie dobraną reakcję PCR z obniżającą się temperaturą przyłączania w poszczególnych cyklach reakcji (*touchdown PCR*). W tab. 12 przedstawiono opracowany schematy amplifikacji 63-56, który jest później wymieniany w tabeli z warunkami przyłączania poszczególnych badanych fragmentów. Pozostałe fragmenty były amplifikowane w sposób typowy, jedyną zmienną była temperatura przyłączania (tab. 11, 12, 13).

Tabela 12. Reakcja PCR (63-56) z obniżającą się temperaturą przyłączania (*touchdown PCR*)

Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
94°C	5'	1
94°C	30"	15 [obniżanie się temp. przyłączania co cykl o 0,5°C]
63°C	30"	
72°C	30"	
94°C	30"	25
56°C	30"	
72°C	30"	
72°C	7'	1
4°C	∞	

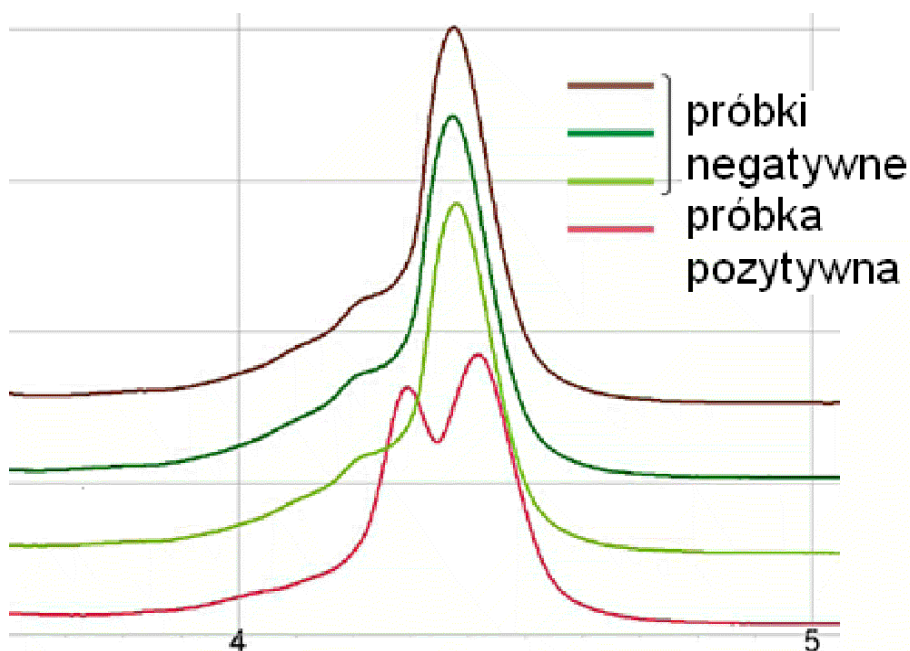
Odmianą tego schematu reakcji PCR był *PCR touchdown* z obniżającą się temperaturą przyłączania starterów od 68°C do 61°C w pierwszych 10 cyklach reakcji, a następnie 30 cykli z temperaturą przyłączania 61°C.

Sekwencje starterów do amplifikowanych fragmentów wraz z dobranymi warunkami przyłączania w reakcji PCR oraz rozdziału w systemie WAVE przedstawiono w tab. 13.

Tabela 13. Sekwencje starterów i warunki analizy wybranych mutacji genu *BRCA1*

Nazwa mutacji	Sekwencja startera	Temp. przyłączenia (°C)	Długość produktu (bp)	Temp. rozdziału WAVE [°C]
185delAG	F-GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT, R-TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT	55	258	55
300T/G (C61G)	F-GTTGTGAGATTATCTTTTCATGGC, R-CTTCCAACCTAGCATCATTACCA	63-56	208	-
3819del5	F-GAGTCCTAGCCCTTTCACCCATAC, R-GTGATGTTCCCTGAGATGCCTTTG	63-56	289	56
4154delA	F-CTAAGAACACAGAGGAGAATTT, R-TCCCCAAAAGCATAAACATTT	63-56	366	56
5382insC	F-ATATGACGTGTCTGCTCCACC, R-AATGAAGCGGCCCATCTC	61	249	59,8

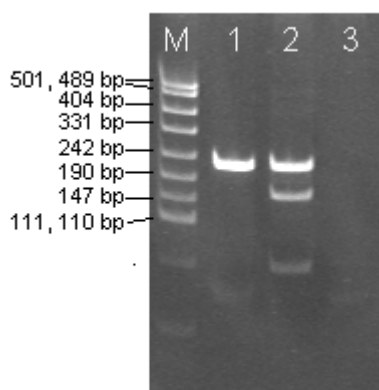
W celu sprawdzenia efektywności amplifikacji, 5µl produktu nakładano na 2% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny. Elektroforezę przeprowadzano pod napięciem 100V przez 20-30 minut. Wizualizacja uzyskanych wyników następowała w świetle UV przy użyciu transiluminatora. Następnie produkty reakcji były analizowane przy użyciu denaturacyjnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (DHPLC). Metoda ta, co podano we wstępie, pozwala na wykrycie mutacji oraz polimorfizmów z bardzo dużą czułością i dokładnością dzięki zastosowaniu zależnej od temperatury analizy heterodupleksów. Analiza DHPLC została przeprowadzona za pomocą urządzenia WAVE System 3500 (*Transgenomic Ltd.*) zgodnie z zaleceniami producenta. Temperatury rozdziału dla poszczególnych eksonów, przedstawione są w tab. 11 i zostały określone przy pomocy oprogramowania *Navigator Software*, w którym również analizowano otrzymane chromatogramy. Ryc. 9 przedstawia przykład z wydrukiem analizy fragmentu 11-13 genu *BRCA1* czterech wybranych przypadków, gdzie w jednym z nich widoczny jest podwójny pik sugerujący obecność zmiany w sekwencji badanego fragmentu.



Rycina 9. Analiza fragmentu 11-13 genu *BRCA1* z zastosowaniem systemu WAVE. Na tle trzech przypadków negatywnych widoczna jest próbka pozytywna o zmienionym wyglądzie piku sugerującym zmianę badanej sekwencji.

Metodą z wyboru detekcji mutacji w przypadku 300T/G (ekson 5 genu *BRCA1*) była RFLP-PCR. Po amplifikacji, produkt reakcji PCR wstępnie uwidaczniano na 2% żelu agarozowym, precypitowano 96° etanolem, suszono, a następnie trawiono 4U enzymu *AvaII* (*Eco471* firmy Fermentas) w 20 μ l mieszaniny (2,5 μ l 10x buforu R do enzymu i 17,1 μ l wody) w warunkach 37°C przez noc. Produkty reakcji PCR po trawieniu rozdzielano na 7% żelu akrylamidowym, który wykonano z użyciem roztworu roboczego zamieszczonego w podrozdziale 5.3. Elektroforezę przeprowadzano pod napięciem 220V przez 20 minut. Następnie rozdzielone w żelu DNA wybarwiano z pomocą roztworu bromku etydyny. Na ryc. 10 zamieszczono przykładowy żel wraz z wielkościami fragmentów reakcji w przypadku bez

obecności i z obecnością mutacji 300T/G po trawieniu enzymem restrykcyjnym.



M - marker wielkości; 1 – niestrawiony fragment bez obecności mutacji; 2 – fragment z 300TIG; 3 – kontrola negatywna.

Rycina 10. Przykładowy żel akrylamidowy, wybarwiony bromkiem etydyny. Zamplifikowano ekson 5 genu *BRCA1* i poddano trawieniu *Avall*.

5.6.2 Analiza molekularna eksonu 11 genu *BRCA1* w 20 wybranych przypadkach

W celu sprawdzenia, czy zbadanie pięciu wymienionych powyżej mutacji ujawnia wszystkie zmiany o charakterze mutacyjnym w genie *BRCA1* u pacjentek z rakiem jajnika zdecydowano się zbadać największy ekson w genie *BRCA1* – ekson 11 (60% sekwencji kodującej genu) pod względem obecności zmian w sekwencji. Ekson 11 został podzielony na 13 fragmentów i amplifikowany z zastosowaniem starterów zaprojektowanych w Katedrze Biologii i Genetyki AM w Gdańsku, na podstawie sekwencji *BRCA1* opublikowanej w bazie Ensemble (nr.: ENST00000337272). Do oceny częstości mutacji wśród pozostałej części grupy nieselekcjonowanych przypadków raka jajnika wybrano losowo osoby, u których nie wykryto dotychczas mutacji: 10 pacjentek z podwyższoną częstością zjawiska LOH (4 lub więcej utrat) z chromosomu 17 oraz 10 bez obecności LOH.

Określenie obecności wariantów sekwencji w badanych 13 fragmentach eksonu 11 genu *BRCA1* przeprowadzono przy użyciu denaturacyjnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (DHPLC). Temperatury rozdziału dla poszczególnych eksonów zostały przedstawione w tab. 14. W przypadku fragmentu 11-11 dla objęcia właściwą temperaturą rozdziału całości fragmentu stosowano dwukrotną analizę w dwóch różnych temperaturach.

Tabela 14. Sekwencje starterów i warunki analizy eksonu 11 genu *BRCA1*.

Frag. eksonu 11 genu <i>BRCA1</i>	Sekwencja startera	Temp. przyłączenia (°C)	Długość produktu (bp)	Temp. rozdziału WAVE [°C]
11-1	F-TAGCCAGTTGGTTGATTTCC R-CTCACACAGGGGATCAGCATTC	63-56	476	55
11-2	F-CAACATAACAGATGGGCTGGAAG R-ACGTCCAATACATCAGCTACTTTGG	66	296	56,8
11-3	F-GCAGCATTAGAAAGTTAATGAG R-GGCCTGATGTAGGTCTCCTTT	56	405	55,7
11-4	F-AGGAGCATTTGTTACTGAG R-AGACTTCCTCCTCAGCCTATT	52	397	54,5
11-5	F-ATCCACAATTCAAAGCACC R-TCTTCTTTTTCTTCTTTGGA	58	401	56,5
11-6	F-CTAAGTGTTCAATACCAGT R-ATTTCTATGCTTGTTCCCG	52	412	55,2
11-7	F-ATCCATTGGGACATGAAGTTA R-CTTGATTTCTTCTTTTTGT	50	240	56,2
11-8	F-GCCAGTCATTTGCTCCGTTTTTC R-CGTTGCCTCTGAACTGAGATGATAG	55	288	56
11-9	F-TGCAGGCTTTCCTGTGGTTG R-GGCTAATTGTGCTCACTGACTTGG	60	305	55
11-10	F-TCAATGTCACCTGAAAGAGAAATGG R-CAGGATGCTTACAATACTTCCAGG	55	301	56,2
11-11	F-TTGAATGCTATGCTTAGATTAGGGG R-TTCTGAGGACTCTAATTTCTTGG	56	402	55,4/56,8
11-12	F-GAGTCCTAGCCCTTTCACCCATAC R-GTGATGTTTCTGAGATGCCTTTG	63-56	289	56
11-13	F-CTAAGAACACAGAGGAGAATTT R-TCCCCAAAAGCATAAACATTT	63-56	366	56

5.6.3 Analiza eksonów 10 i 11 genu *BRCA2*

W związku z omówioną we wstępie podwyższoną częstością mutacji germinalnych w obrębie regionu OCCR w przypadku występowania raka jajnika badaniem zdecydowano się objąć eksony 10 i 11 genu *BRCA2* (60% sekwencji kodującej), podzielone dla potrzeb techniki DHPLC odpowiednio na 5 i 19 fragmentów (tab. 15). Startery do badanych fragmentów zaprojektowano w Katedrze Biologii i Genetyki AM w Gdańsku na podstawie sekwencji *BRCA2* z bazy Ensemble (<http://www.ensembl.org>, nr.:ENST00000267071). Wpierw były one amplifikowane techniką PCR, wstępnie sprawdzane na 2% żelach agarozowych, a następnie rozdzielane w systemie WAVE po dobraniu specyficznych warunków rozdziału (tab. 15). Część fragmentów wymagała użycia wyższego stężenia starterów (25µM) oraz wyższego stężenia dNTP (10 mM), co odpowiednio zaznaczono w tabeli 15. Dla objęcia w całości fragmentów 11-18 i 11-19 właściwą temperaturą rozdziału były one dwukrotnie analizowane w dwóch różnych temperaturach.

Tabela 15. Sekwencje starterów i warunki analizy eksonów 10 i 11 genu *BRCA1*.

Frag. eksonu 10 i 11 genu <i>BRCA2</i>	Sekwencja startera	Długość produktu (bp)	Temp. przyłączenia (°C)	Temp. rozdziálu WAVE [°C]
10-1	F-TATAAAATATTAATGTGCTTCTGTT R-AAAGGGCTTCTGATTTGCTAC	374	63-56	52,5
10-2	F-ATCTGAAGTGGAAACCAAATGATAC R-ACGTGGCAAAGAATTCTCTGAAGTAA	280	63-56	55
10-3	F-TTTCAGAAAAAGACCTATTAGACA R-CTTTTTGATACCCTGAAATGAAGAAG	241	63-56	54,4
10-4*	F-CAGCATCTTGAATCTCATAACAG R-CTGGCCAGCTTCCATTATC	280	58	54,7
10-5	F-TTTAATTGATAATGGAAGCTGG R-TTACAAAAAAAAAAGACAGAGGT	268	63-56	54,2
11-1*	F-TTTAGTGAATGTGATTGATGGT R-CAAGATCCTGAGAGATTACTG	207	56	54
11-2*	F-TAGCTCTTTTGGGACAATTC R-ATAAAAGACTTTTCTGGGATTG	323	55	54,2
11-3*	F-TGGAATACAGTGATACTGAC R-ATACATCTTGATTCTTTTCCAT	228	54	54,2
11-4*	F-ATGGAAAAGAATCAAGATGTAT R-GTCTCCATATAAACCATGGA	354	55	55,5
11-5	F-CGAACCCATTTTCAAGAACTCTACCA R-TGTAATCATTATTTTTTCTGG	487	63-56	53,3
11-6	F-TTGGTTTATGTTCTTGAGAGGAG R-CCTTTTGGCTAGGTGTTAAATTATGG	487	63-56	53,3
11-7*	F-GTCATATAACCCCTCAGATG R-CTTGCTGCTGTCTACCTG	290	55	54,5
11-8*	F-CGATTGGTCAGGTAGACAGC R-CCTCTGCAGAAGTTTCTCAC	249	60	57,5
11-9	F-GAAATTAACGGAAAGTTTGCTGG R-TGAATCACTGCCATCAAATTCTAAG	465	63-56	52,1
11-10	F-AATGACTACTGGCACTTTTGTTG R-CACTTGCAGTCTGAAAAATGTATC	401	63-56	53
11-11	F-TTGTGAGATTTAACTTTTTTGGAAAG R-CAACTGGGACACTTTCTTTTCCAG	343	63-56	53
11-12*	F-GTGTGCGCCAAAGAGTCATTT R-AGTACCTTGCTCTTTTTTCATC	350	56	54,3
11-13*	F-CAGCTAGCGGGAAAAAAGTTA R-ACAAGGTTTTTATCATTATTG	238	49	55,7
11-14	F-TGAGACCATTGAGATCACAGC R-TAGTCACAAGTTCCTCAACGCA	707	63-56	52,5
11-15	F-GCCAGTATTGAAGAATGTTGAAGATC R-AAACCTTATGTGAATGCGTGCTAC	443	68-61	55,1
11-16	F-AACGAAAATTATGGCAGGTTGTTAC R-GCTTTCCAATTGCTGTACTAAATCC	536	68-61	54,2
11-17	F-CCAGCTCACAAGAGAAGAAAATACTG R-TTACGTTTTTAGGTGAAGCCTGTTC	503	68-61	53,5
11-18	F-AAACCCAGAGCACTGTGTAAACTC R-TCTCCTCTTCTTTTTCCAATTCTTG	489	68-61	53,7/55,2
11-19	F-GACAGATTCTAAACTGCCAAGTCATG R-TAACCATACTCCCCAAACTGAC	267	68-61	55,3/56,4

stężenie starterów (25µM), stężenie dNTP (10 mM)

5.6.4 Sekwencjonowanie wybranych produktów PCR

W celu określenia rodzaju mutacji lub występowania innej zmiany w DNA próbki wykazujące zmieniony profil pików w analizie DHPLC powtórnie amplifikowano za pomocą reakcji PCR. Uzyskane w ten sposób produkty sprawdzane były za pomocą elektroforezy agarozowej i następnie oczyszczane przy użyciu zestawu *Clean-up* (A&A Biotechnology). Prowadzono bezpośrednie sekwencjonowanie zamplifikowanego produktu PCR, stosując zarówno starter sensowny jak i antysensowny. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania przedstawiono w tab. 16.

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej do sekwencjonowania

Składnik mieszaniny:	Ilość / próbkę
Terminator Ready Reaction Mix	2 μ l
Bufor do sekwencjonowania 2,5x	4 μ l
Matrycowe DNA (product PCR)	~25ng
Starter [1 μ M]	2 μ l
Woda	do 20 μ l

Reakcję amplifikacji do sekwencjonowania prowadzono zgodnie z zaleceniami firmy ABI Biosystems – warunki znajdują się w tab. 17.

Tabela 17. Warunki amplifikacji produktu do sekwencjonowania

Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
95°C	2'	1
96°C	10"	25
50°C	5"	
60°C	4'	
4°C	∞	

W celu pozbycia się nadmiaru znakowanych dideoksynukleotydów (ddNTPs) produkt reakcji czyszczono przy użyciu zestawu *Exterminator* (A&A Biotechnology). Tak przygotowaną próbkę denaturowano przy użyciu termocyklera w temperaturze 95°C przez 3 minuty i natychmiast chłodzono do 4°C. Próbki następnie analizowano w automatycznym sekwenatorze.

Sekwencje odczytywane były przy filtrze E i zapisywane przy użyciu programu komputerowego ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0. Zebrane dane analizowane były przy pomocy programu ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software v. 3.4. Otrzymaną sekwencję porównywano z sekwencją prawidłową za pomocą programu Sequencher v. 4.1.2 (demo).

5.7 Analiza statystyczna wyników

Do porównania rozkładów uzyskanych wyników wykorzystano test χ^2 Pearsona, test χ^2 dwustronny Fishera. Dla potrzeb obliczeń we wszystkich analizach odrzucono przypadki nieinformacyjne oceniając tylko obecność utraty heterozygotyczności *versus* nieobecność LOH. Aby rozstrzygnąć, czy badane zmienne miały rozkład normalny zastosowano test W Shapiro-Wilka. W przypadku rozkładów normalnych testem Levene sprawdzono jednorodność wariancji i odrzucono użycie t-testu.

Do porównania median zmiennych ciągłych w dwóch grupach zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitney'a. Dla oceny wpływu zmiennych niezależnych na wystąpienie mutacji genów *BRCA1/2* użyto szybkiej regresji logistycznej.

Dla porównania przeżycia w grupach pacjentek z mutacją i bez mutacji oraz z utratami markerów i bez utrat użyto testu log-rank w oparciu o krzywe Kaplana-Meyera. Aby ocenić w grupie zmiennych niezależnych, które z nich wpływają na przeżycie zastosowano nieparametryczny model proporcjonalnego hazardu Coxa.

We wszystkich przeprowadzonych analizach za statystycznie znaczącą przyjęto wartość $p \leq 0,05$.

Obliczeń dokonano z zastosowaniem oprogramowania STATISTICA for Windows 7.1 firmy StatSoft. [172, 173]

6. WYNIKI

6.1 Analiza utraty heterozygotyczności (LOH)

Badania LOH przeprowadzono w 156 guzach za pomocą ośmiu markerów mikrosatelitarnych z chromosomu 17 oraz siedmiu markerów z 13q. Dodatkowo wykonano badanie LOH z użyciem dwóch markerów zlokalizowanych w chromosomach 15 i 16 (tab. 18).

Tabela 18. Wyniki analizy LOH poszczególnych analizowanych próbek dla markerów z chromosomu 17, 13, 15 i 16.

nr krwi	D17S1584	D17S953	D17S1880	D17S1323	D17S855	D17S1861	D17S1811	D17S1830	D13S175	D13S1246	D13S260	D13S171	D13S267	D13S264	D13S285	D15S97	D15S205	D16S403	16S3089
	chromosom 17								chromosom 13					chr 15	chr 16				
2		NI	0	NI	0	NI	1	1	0	0		1	NI	0	NI	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0	1	NI	0	1	1	1	NI	1	1	0	0
21	0	0	NI	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI
23	0	NI	1	1	NI	1	1	1	1	0	1	NI	0	NI	1	0	0	0	0
32	NI	NI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NI	NI	1	0	0	NI	1
37	1	1	1	NI	NI	1	1	1	NI	NI	1	NI	1	1	1	NI	0	NI	1
40	0	NI	1	0	0	1	0	0	NI	0	0	0	NI	0	NI	NI	0	NI	0
44	NI	0	1	1	1	0	1	1	1		1	0	1	1	1	0	0	NI	
46	NI	0	1	0	1		0	NI	0	NI		NI	NI	0	0				
47	1	NI	0	0	1	1	0	0	0	0	0	NI	0	0	NI	0	0	0	0
49	1	1	1	NI	1	1	1	1	1	1	NI	NI	NI	1	1	0	0	0	1
52	0	NI	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	NI	0	NI	0	0	0	0	0
53	1	0	NI	NI	NI	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	NI	1	0	NI
56	1	1	1	1	1	1	1	NI	1	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	1
58	1	NI	1	0	1	0	1	NI	0	NI	0	1	NI		0	1	0	NI	
60	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	NI	0	0	0
63	1	0	0	NI	0	1	1	NI	0	1	0	0	0	0	0	0	NI	0	0
65	1	NI	1	NI	1	1	1	NI	1	NI	NI	NI	0	NI	0	1	1	1	0
66	1	NI	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	1	0
68	1	1	1	1	0	0	1	1	NI	0	0	0	NI	NI	0	0	0	0	0
69	NI	0	0	0	0		1	0											
72	1	1	1	1	1		1			NI	0	NI	0	0	0				
73	1	1	NI	0	1		NI	1	0	1	1	NI	1		1	0	NI	NI	0
74	1	NI	1	NI	1	0	1	1	1	1	0	1	NI	1	1	0	NI	0	1
76	0	1	1	NI	0	0	1	1	1	1	1	1	1			1	NI	1	0
77	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0			0	0			
82	1	1	1	NI	1	1	1	1	NI	0	0	0	NI	0	0	1	NI	0	1
84	1	NI	1	NI	1	1	1	1	NI	NI	1	NI	NI	NI	1	1	1	NI	0
85	0	0	0	1		0	1	0	0	0	1	NI	NI	0	0	0	0	NI	0
90	0	0	0	1	0	0	1	0						NI	1				
92	0	1	1	0	NI	0	1	NI	0	0	0	NI	1	NI	0	1	1	0	0
93	0	NI	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	0	0	0
94		1	1	1	1	0	NI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

95	0	0	0	0	NI	1	0	NI	0	0	0	0	NI	0	0	1	0	0	0
96	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	1	0	0	0	0
97	0	NI	0	0	0	0	0	NI	NI	1	0	0	0	NI	0	NI	0	0	0
99	1	NI	1	NI	1	0	1	1	0	NI	1	0	NI	NI	0	0	1	0	NI
100	0	NI	0	0	0	0	0	0		NI	0	0	NI		0	0	0	0	0
102	1	NI	NI	0	0	0	NI	0	0	NI	0	NI	0	0	NI	0	0	0	0
104	0	NI	0	NI	0	0	0	NI	NI	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0
108		NI	1	NI	1	1	1	0	0	0	0		NI		NI	1	0	1	1
110	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NI	0	0	0	1	1
111	0	NI	NI	0	0	1	0	0	NI	1	0	0	NI		1	NI	1	0	0
112	NI	NI	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	1	0	0
113	1	NI	1	1	0	1	1	0	1	NI	1	0	1	1	0	0	0	0	0
115	0	1	0	NI	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	NI	NI	0	0
118	0	NI	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0
120	1	NI	0	1	1	0	1	1	0	NI	NI	1	1	1	1	0	1	0	1
121	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	NI	0	1	1	1	NI	1	0	1
122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0
124	1	0	1	1	1	1	NI	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
125	0	1	0	0	0	0	NI	1	NI	NI	1	0	1	0	0	0	0	0	0
126	0	0	NI	0	NI	0	0	NI	NI	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0
127	1	1	1	1	1	1	1	1	NI	0	0	0	0	1	1	1	1	NI	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	0	0	0	0	NI	0	0	0
129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	1	1
131	1	1	0	1	0	0	NI	0	1	NI	1	1	1	0	1	1	NI	1	1
132	1	NI	1	1	1	NI	1	1	NI	NI	0	1	0	0	0	0	0	0	1
133	0	0	1	0	1	NI	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134	NI	0	1	NI	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
135	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
136	1	1	NI	1	NI	0	1	NI	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	1	NI
137	1	NI	NI	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	NI	1	NI	0	NI	NI
138	0	1	1	NI	1	0	1	1	NI	NI	0	NI	0	NI	NI	0	0	0	NI
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
141	0	NI	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NI	NI	0	0
144	1	NI	1	1	1	0	1	NI	0	NI	1	1	1	1	NI	NI	NI	1	1
145	0	NI	1	NI	1	1	1	NI	1	1	1	1	1	1	1	0	0	NI	1
150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
152	1	1	NI	NI	NI	0	1	1	1	NI	1	0	1	1	1	0	NI	0	1
##	1	1	NI	NI	NI	NI	1	1	NI	1	1	0	1	NI	1	0	0	1	1
155	0	0	0	NI	0	0	NI	0	NI	0	0	0	0	0	0	NI		0	NI
157	1	1	1	NI	NI	1	1	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	1	1	0
158	0	NI	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
159	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	NI	1	NI	1	0	0
160	0	0	NI	NI	NI	1	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0
161	1	NI	1	NI	NI	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
165	1	NI	1	NI	1	0	1	1	NI	1	1	1	1	1	1	1	0	NI	0
166	1	NI	1	1	1	1	1	1	NI	NI	1	1	NI	1	1	0	0	1	1
167	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	NI	NI
169	0	NI	0	0	0	NI	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
170	0	0	0	NI	0	0	0	0	NI	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
171	1	1	1	NI	1	NI	1	1	1	1	1	0	1	1	NI	1	1	1	1
172	1	1	1	1	1	1	1	0	NI	1	1	1	1	1	1	1	1	0	NI
173	0	0	0	0	NI	0	NI	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
175	1	1	0	0	1	0	1	1	0	NI	0	1	1	0	NI	0	0	0	0

176	0	1	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0	0	NI		0	0	1	0	0
177	NI	0	0	NI	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1		0	0
179	0	1	1	1	NI		1	NI	1	1	1		1	1	1	0	1	NI	0
180	NI	NI	NI	0		0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	0	0
181	NI	1	NI	1		1	0	0	NI	0	0	0	1	NI	NI	1	0	NI	0
182	1	NI	1	1	NI	NI	1	1	NI	NI	1	1	1	NI	1	NI	0	0	0
183	1	1	1	1		1	1	NI	1	NI	1	1	1	1	1	0	1	0	1
184	1	NI	1	1		NI	0	1	1	NI	0	1	1	1	1	1	0	0	0
185	NI	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NI	NI	NI	NI	0	0	0
186	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0
187	1	NI	NI	NI	NI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	NI
189	1	1	1	NI	NI	1	1	1	0	0	0	0	0	0	NI	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	NI	NI	1	NI	NI	1	1	1	1	1	1	1	0	0
191	1	0	1	NI	1	1	1	NI	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192	1	0	1	1	0	1	1	1	NI	NI	0	0	0	NI	1	0	1	0	NI
194	0	0	0	NI	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
195	0	0	NI	NI		0	NI	0	0	NI	0	NI	0	0	NI	0	NI	0	0
196	NI	NI	1	NI		1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	NI	1	1	NI
197	0	0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0	NI	0	0	0	0	NI	0
198	NI	1	1	NI	1	1	1	1	1	NI	1	NI	1	1	1	1	1	1	1
199	0	0	1	NI	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	1	NI	0	1	1	NI	1	1	1	NI	1	1	1	1	1	1	0
201	1	0	1	1	NI	1	NI	NI	NI	1	1	NI	1	1	NI	0	NI	0	NI
203	NI	0	0	0	0	0	NI	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	NI
204	1	NI	1	NI	1	0	NI	NI	0	1	1	1	NI	1	0	NI	NI	0	0
205	NI	0	NI	NI	1	1		1	NI	1	0	NI	NI	1	1	0	1	0	NI
206	0	1	1	1	1	0	NI	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
208	0	NI	1	1	1	1	NI	1	1	1	1	1	1	1	NI	1	1	0	0
209	0	0	0	NI	NI	0	0	0	NI	0	0	NI	NI	0	0	0	0	NI	0
211	NI	0	0	1	0	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	1	0	0	0	0	0	0	0
213	1	1	1	1	1	1	NI	1	NI	NI	0	1	1	NI	1	1	0	0	1
214	0	0	0	0	0	0	0	0	NI	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
215	1	1	1	NI	1	NI	NI	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
216	1		1	0	1	1	1	1	NI	1	1	1	NI	1	1	0		NI	0
217	1	1	1	1	1	1	1	1	NI	0	1	0	1	NI	1	0	0	NI	1
218	0	NI	0	NI	1	1	0	0	NI	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
219	1	NI		0	NI	1	1	0	1	1	1	1	NI	1	1	0	0	0	0
220	NI	1	NI	NI	1	1	1	1	NI	1	1	NI	NI	1	1	1	1	0	0
221	1	0	0	0	0	0	0	NI	0	NI	0	1	0	0	0	NI	0	0	0
222	0	1	1	1	1	NI	1	NI	1	1	1	1	1	1	NI	NI	1	0	1
223	1	0	1	NI	1	1	NI	NI	1	1	NI	NI	NI	NI	1	NI	1	1	
224	0				0	1	NI		0			NI			NI		1		
225	1	1	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	1	1	1	1	NI	1	0	1
226	0	1	1	NI		1	1	1	1	NI		1	NI		1	1	1	1	0
227	1	NI		0		1		0	1	1	1	1	0		NI	1	1	0	1
228	1	NI	1	1		NI			NI	0		NI	0	NI	1	0	1	1	1
229	0	1				0		0	NI	0	0	NI	NI	NI	0		1		
230	0	0	0		0	NI	1	0	0	NI	0	NI	NI	0	0		0		
231	NI		1	NI		1	0	1	1	NI	1	1	1	NI	1		0		
232	1	1	NI	1	0	1	1	0	NI	0	1	NI	1	1	0		NI		
233	1	1	1	NI	1	0	0	1	NI	1	1	NI	1	1	0	1	1	1	1
234	1	1	0	NI	NI	0	0		NI	0		NI	1	1	1	NI	0	0	

235	0	1	0	0	NI	NI	1		0	NI		0	0	0	0	NI		0	0
237	1	1	1		1	1	0	1	NI	NI	0	1	1	1	NI	1	0	0	1
238	1	NI	1		1	NI	0	NI	1	NI	0	1	NI	1	1	0	0	0	0
243	NI	0	0	1	0	0	1	NI	0	0	1	0	0	0	NI		0		
245	1	1	1	NI	1	0	0	1	0	0	NI	0	1	NI	1	1	1	0	0
249	0	0	0	NI	0	0	1	0	NI	0	0	0	0	NI	0		0		
251	1	1	NI	0	1	0	0	1	1	0	NI	1	1	1	1	1	0	0	0
253	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	NI	NI	NI	0		0		
254	1	NI	1		1	1		NI	1	0	1	1	1	1	1	NI	0		
255	1	1	1	1	1	1		1	0	0	NI	1	NI	NI	NI	1	1	0	1
256	0	0	NI	0	0	0	1	NI	0	NI	1	NI	0	0	0		0		
257	0	0	NI	0	NI	0	0	1	0	1	NI	NI	0	0	0		0		
708	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	NI	0	0	1	0	1		
709	1	1	NI	0	0	NI	0	0	NI	0	0	1	1	0	0	NI	NI	0	0
766	0	NI	1	1	NI	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	1		0	0	0
790	0	0	1	NI	0		0	NI	0	0	0	0	0	1	0			0	0
792	NI	0	NI	0	1		0	0	0	NI	0	1	0	0	0			1	0

1 utrata heterozygotyczności

0 brak utraty

NI przypadek nieinformacyjny

 brak danych

Dla markerów z chromosomu 17 wynik uzyskano z 1201 próbek na 1248 ogółem badanych (96%), przy czym 23% (276) okazało się być nie informacyjnymi. Zjawisko LOH zaobserwowano w 501 spośród 925 informacyjnych przypadków (54%). Utraty w przynajmniej jednym markerze zaobserwowano w 128 przypadkach (82%).

Na chromosomie 17 najczęściej ulegały utracie markery D17S1880 (58%) i D17S1811 (57%). Dwa markery położone wewnątrzgenowo w intronie 12 *BRCA1*: D17S1323 oraz w intronie 20: D17S855 były tracone odpowiednio w 47% oraz 53% przypadków informacyjnych.

W dwóch guzach doszło do utraty wszystkich ośmiu markerów z chromosomu 17. Były to raki nabłonkowe o niskim zróżnicowaniu w stadium FIGO IIIB i IIIC, usunięte od pacjentki nr 127 z negatywnym wywiadem rodzinnym oraz chorej nr 150 o nieznanym wywiadzie rodzinnym (zachorowanie w wieku 56 lat, zgon okołooperacyjny - tab. 4).

Utraty czterech i więcej markerów z chromosomu 17 zaobserwowano w 75 guzach (48%). W 12 przypadkach doszło do utrat siedmiu (8%), a w 16 przypadkach do utrat sześciu loci (10%).

Dla markerów z chromosomu 13 wynik uzyskano z 1053 próbek na 1092 ogółem badanych (96%), w tym przypadków nie informacyjnych było 225 (21%). Utraty heterozygotyczności odnotowano w 370 przypadkach spośród 828 (45%). Utratę co najmniej jednego locus uzyskano w 108 przypadkach (69%).

Na chromosomie 13 najczęściej ulegał utratom marker D13S171 (51%), który leży 13qter w stosunku do *BRCA2*. Kolejnym traconym markerem był D13S285 (48%).

Spośród markerów sąsiadujących z locus genu *BRCA2*, centromerowo położony marker D13S260 był tracony w 38%, zaś kolejny, zlokalizowany telomerowo w stosunku do D13S171, D13S267 - w 35% przypadków.

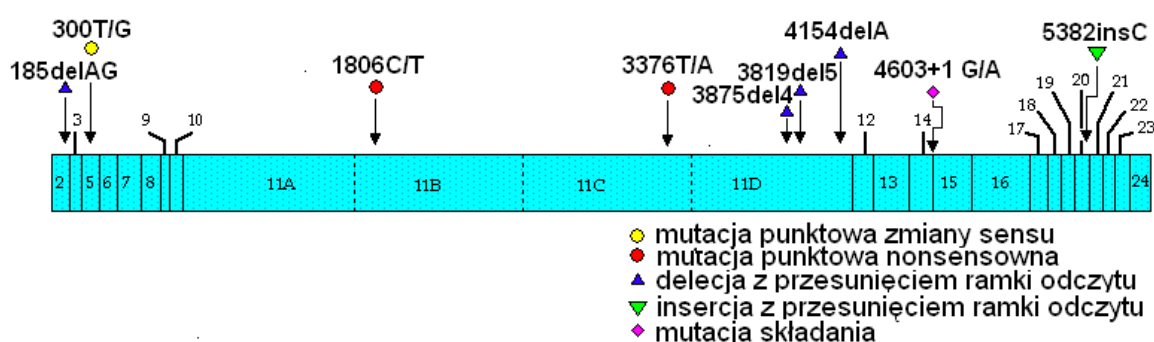
Utraty co najmniej czterech markerów z 13q wykazano w 52 guzach (33%). W ośmiu spośród 156 guzów doszło do utraty wszystkich 7 markerów z 13q (próbki nr: 94, 134, 135, 145, 150, 187, 215 i 225). W tych guzach obserwowano również co najmniej cztery utraty z chromosomu 17. U dwóch pacjentek odnotowano wywiad rodzinny pozytywny, u jednej wywiad był nieznany (nr 150). Guzy, w których zaobserwowano tak liczne utraty, były rakami nabłonkowymi surowiczymi lub niskozróżnicowanymi, we wszystkich przypadkach z wyjątkiem nr 215, w stadium zaawansowania klinicznego IIIC.

W dodatkowym zestawie czterech wysoce polimorficznych markerów z chromosomów 15 i 16 odnotowano utraty heterozygotyczności, aczkolwiek uzyskano niższe częstości występowania tego zjawiska w porównaniu do wyżej opisanych markerów. W przypadku chromosomu 15 utraty obu markerów obserwowano w 36% (dla porównania 45% utrat występowało na chromosomie 13). Natomiast dla obu markerów z chromosomu 16 obserwowano utraty w 24% próbek (dla porównania, dla wszystkich markerów z chromosomu 17 stwierdzono w 54%). Gdy wystąpiły utraty trzech lub czterech markerów z chromosomów 15 i 16, porównano w tych przypadkach wzory utrat markerów z chromosomów 17 i 13. W 15 takich przypadkach, spośród markerów z chromosomu 17 tracone były co najmniej

dwa, a pięć i więcej było utraconych w 10 guzach. Z kolei na chromosomie 13, w dwóch guzach odnotowano brak utrat, w trzech tylko jeden marker był tracony, a w ośmiu przypadkach również było to pięć i więcej traconych loci.

6.2 Analiza wyników badania mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*

Przeprowadzono analizę najczęstszych mutacji genu *BRCA1* w eksonach 2, 5, 20 i fragmencie 11-12 i 11-13 eksonu 11 z pomocą technik DHPLC oraz RFLP-PCR u 151 nieselekcjonowanych pacjentek z rakiem jajnika. Znalaziono ogółem 17 mutacji (11,25%), które zostały wyszczególnione w tabeli 19. Dodatkowo, prócz oczekiwanych mutacji, w próbce nr 74, w trakcie analizy DHPLC fragmentu 11-12, znaleziono nową zmianę w wyglądzie prążków w systemie WAVE i w wyniku sekwencjonowania wykryto mutację 3875del4 (ryc.11).



Rycina 11. Spektrum mutacji genu *BRCA1* wykrytych w niniejszej pracy zaznaczonych na schemacie genu.

W drugiej fazie doświadczeń badano ekson 11 genu *BRCA1* w grupie 10 losowo wybranych pacjentek, gdzie w DNA z guzów stwierdzono wysoką częstość zjawiska LOH (≥ 4) i 10, u których nie stwierdzono występowania LOH na chromosomie 17. Znalaziono trzy mutacje: dwie nonsensowne 1806C/T w próbce nr 100 (brak utrat) i nr 161 (5 markerów utraconych) oraz *splicingową* 4603+1 G/A w próbce nr 201 (4 markery utracone) (tab. 19, ryc.11 i ryc. 12). Oprócz tego wykryto cztery zmiany polimorficzne (tab. 20).

Tabela 19. Rodzaj i lokalizacja mutacji wykrytych w badanych regionach genu *BRCA1*.

Nazwa	gen <i>BRCA1</i>	zmiana sekwencji	zmiana aminokwasu	typ mutacji
-------	------------------	------------------	-------------------	-------------

185delAG	ekson 2	del AG	Stop 39	F
300T/G (C61G)	ekson 5	T na G	Cys na Gly	M
1806C/T	ekson 11	C na T	Gln na Stop	N
3819del5		del GTAAA	Stop 1242	F
3875del4		del GTCT	Stop 1262	F
3376T/A		T na G	Leu na Stop	N
4154delA		del A	Stop 1365	F
4603+1 G/A	ekson 14	G na A	IVS14+1G>A	S
5382insC	ekson 20	ins C	Stop 1829	F

F-mutacja przesunięcia ramki odczytu; N-mutacja braku sensu; M-mutacja zmiany sensu; S-mutacja *splicingowa*.

Tabela 20. Rodzaj i lokalizacja zmian polimorficznych znalezionych w eksonie 11 genu *BRCA1* (wśród 20 pacjentek losowo wybranych).

Zmiana nukleotydowa	Lokalizacja	Zmiana sekwencji	Zmiana aminokwasu	Wykryta częstość (%)
Q356R	ekson 11	1186A/G	Gln na Arg	10
D693N		2196G/A	Asp na Asn	5
2201C/T		2201C/T	Ser na Ser	10
E1038G		3232A/G	Glu na Gly	50

Badanie eksonów 10 i 11 genu *BRCA2* przeprowadzone w grupie 141 pacjentek (z powodu zbyt małej ilości DNA nie zbadano próbek: 49, 99, 111, 112, 113, 126, 169, 708) z użyciem DHPLC wykryło cztery mutacje skracające produkt białkowy (przypadki: 84, 93, 183, 212) i 11 różnych zmian polimorficznych (tab. 21 i tab. 22). Znaleziono też dwie zmiany typu *missense* (2014G/C, 5298A/C), tzw.: nieznane warianty w sekwencji DNA, których wpływ na funkcjonalność białka nie jest znany. W przypadku zmiany D596H wystąpiła ona tylko u jednej pacjentki nr 709, u której zachorowanie na raka jajnika wystąpiło w wieku 24 lat, a wywiad rodzinny był negatywny.

Tabela 21. Rodzaj i lokalizacja mutacji wykrytych w eksonie 11 genu *BRCA2*.

Nazwa	gen <i>BRCA2</i>	zmiana sekwencji	zmiana aminokwasu	typ mutacji
4206ins4	ekson 11	ins TGCT	Stop 1330	F
4451delA		del A	Stop 1409	F
4668T/G		T na G	Y1480X	N
6621del4		del ATTA	Stop 2135	F

F-mutacja przesunięcia ramki odczytu; N-mutacja braku sensu.

Tabela 22. Rodzaj i lokalizacja zmian polimorficznych znalezionych w analizowanym regionie genu *BRCA2* (wśród 141 pacjentek).

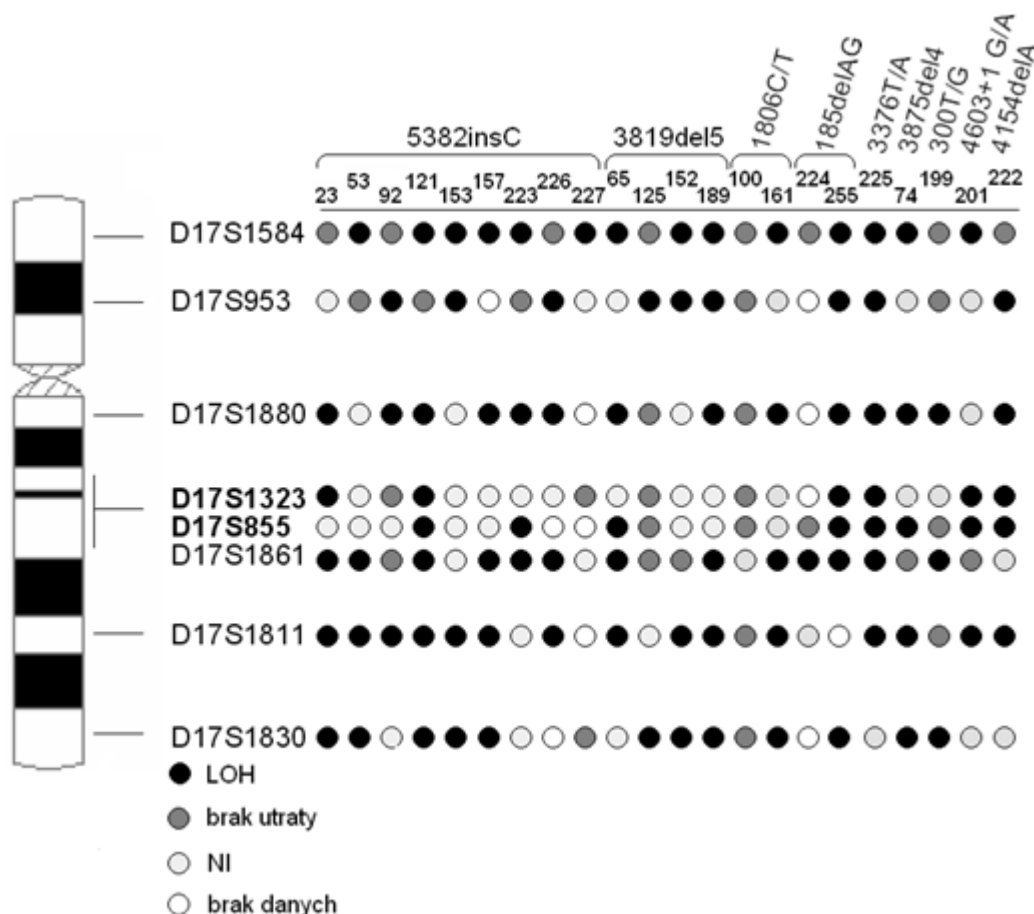
Zmiana nukleotydowa	Lokalizacja	Zmiana sekwencji	Zmiana aminokwasu	Wykryta częstość (%)
N289H	ekson 10	1093A/C	Asn na His	3,5
H372N		1342A/C	His na Asn	37,6
S455S		1593A/G	Ser na Ser	7,1
D596H (UV)		2014G/C	Asp na His	0,7
H743H		ekson 11	2457T/C	His na His
Q961Q	3111G/A		Gln na Gln	2,1
N991D	3199A/G		Asn na Asp	12,1
3624A/G	3624A/G		Lys na Lys	39
V1269V	4035T/C		Val na Val	18,4
D1420Y	4486G/T		Asp na Tyr	2,1
K1690N (UV)	5298A/C		Lys na Asn	2,1
T1915M	5972T/C		Thr na Met	8,5
IVS11+80 del4	intron 11		7069+80delTTAA	-

Analiza 151 nieselekcjonowanych przypadków raka jajnika pozwoliła na wykrycie mutacji genów *BRCA1* i 2 u 21 chorych (13,9%), w tym mutacji *BRCA1* 81%, a mutacji *BRCA2* 19%. Najczęściej znajdowaną mutacją była 5382insC (4%) a drugą co do częstości stwierdzaną mutacją była 3819del5 (3%). Dwukrotnie wśród znalezionych wystąpiła mutacja 1806C/T (1,3%). Pozostałe wykryte mutacje wystąpiły u pojedynczych pacjentek.

Utraty LOH z 17 chromosomu w grupie pacjentek z germinalnymi mutacjami *BRCA1* wystąpiły w każdym przypadku wykrytej mutacji, aczkolwiek tylko w 11 na 19 przypadków stwierdzono utraty w liczbie ≥ 5 . W przypadku nr 224 znaleziono zaledwie jedną utratę, niestety w tym przypadku próbka guza była preparatem parafinowym i udało się zamplifikować zaledwie cztery na siedem loci w DNA z guza (tab. 18, ryc. 12). Wzory utrat pokazane na rycinie 12 nie wydają się w szczególności

wykazywać utrat markerów wewnątrzgenowych *BRCA1* w przypadkach mutacji *BRCA1* (oba markery były tracone zaledwie w czterech przypadkach, a pojedynczo w pięciu z 26). Na chromosomie 13 utraty obserwowano w trzech wymienionych przypadkach mutacji *BRCA2* spośród czterech wykrytych. Dla markerów sąsiadujących z locus genu *BRCA2* i przypadków mutacji tego genu tylko w przypadku nr 183 były one utracone oba, pojedynczo zaś w dwóch z pozostałych trzech (tab. 18).

W przypadku nr 93 (mutacja *BRCA2*, 6621del4) nie odnotowano w ogóle utrat, aczkolwiek na obu badanych chromosomach zaobserwowano po dwa nie informacyjne loci. Z kolei w przypadku nr 212 u pacjentki z mutacją 4668T/G genu *BRCA2* odnotowano tylko jedną utratę w locus D13S171 na chromosomie 13 i żadnych utrat na chromosomie 17. U pacjentki nr 189 z aż sześcioma markerami traconymi na chromosomie 17 (oraz dwa razy NI) i obecnością mutacji 3189del5 *BRCA1* nie stwierdzono z kolei żadnych utrat markerów z chromosomu 13q.



Rycina 12. Wzór utrat markerów z chromosomu 17 w rakach jajnika 26 przypadków z mutacjami genu *BRCA1*. Markery wewnątrzgenowe oznaczono boldem.

W przypadku najczęstszej mutacji 5382insC genu *BRCA1* obecnej u dwóch pacjentek z tkanką guza pochodzącą z preparatów parafinowych oraz u siedmiu w grupie sporadycznej, utraty heterozygotyczności markerów z chromosomu 17 wystąpiły w liczbie co najmniej dwóch we wszystkich przypadkach. W niektórych przypadkach z obecnością tej mutacji zaobserwowano niską liczbę utrat, zwłaszcza w DNA z preparatów parafinowych (nr 227 – tylko 11 na 15 loci uległo amplifikacji) albo przypadkami z częstymi nie informacyjnymi wynikami analizy (nr 223 i 153 – sześciokrotnie odnotowane NI; nr 53 – trzykrotnie) (Ryc. 12).

W analizie badanych sekwencji fragmentów genów *BRCA1* i 2 dla 12 z 26 przypadków mutacji, w DNA pochodzącym z guza uzyskano obraz

mutacji w postaci homozygotycznej. Oznacza to utratę w tkance nowotworowej allelu prawidłowego.

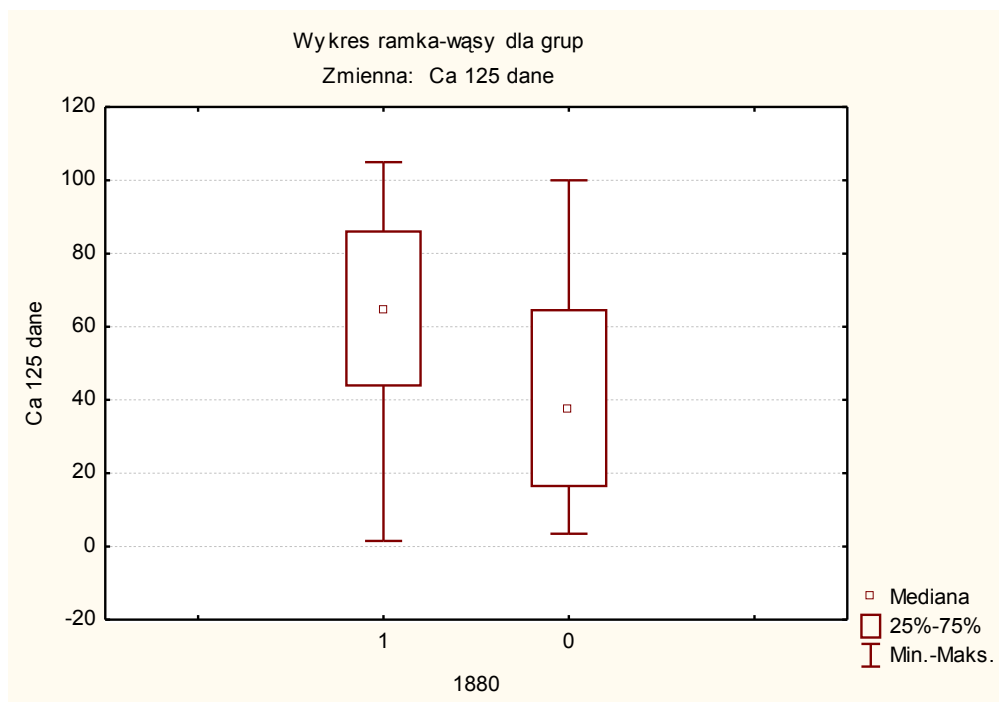
6.3 Korelacje między wynikami badań molekularnych a danymi klinicznymi

Stwierdzono zależność pomiędzy stopniem zaawansowania histologicznego (G) a obecnością utraty heterozygotyczności wybranych markerów mikrosatelitarnych. Wartość skali *Grade* dla celów obliczeniowych została podzielona na dwie grupy chorych: grupę I obejmującą G1 i G2 oraz grupę II obejmującą G3. W grupie II pacjentek, znamienne częściej występowały utraty markerów: D17S1880 ($p=0,002$), D17S1811 ($p=0,005$), D17S1861 ($p=0,034$), D17S1584 ($p=0,03$), D17S953 ($p=0,04$), D17S1323 ($p=0,003$), D17S1830 ($p=0,024$), D13S260 ($p=0,003$), D13S285 ($p=0,03$). W grupie z G3 zaobserwowano wyższą liczbę utrat (≥ 5) dla markerów z chromosomu 17 ($p=0,015$). Dla pozostałych markerów nie stwierdzono takiej zależności.

Nie stwierdzono zależności statystycznych pomiędzy obecnością utrat heterozygotyczności a stopniem FIGO za wyjątkiem markera D13S260 ($p=0,01$) i tendencji do takiej zależności dla markera D17S1811 ($p=0,053$), D17S1830 ($p=0,05$) i D13S175 ($p=0,06$).

W przypadku porównania testem Fishera dwustronnym utrat markerów z chromosomu 17 i obecności mutacji genu *BRCA1* uzyskano znamienność statystyczną dla utrat D17S1880 ($p=0,00759$), D17S1811 ($p=0,01283$), D17S1861 ($p=0,0067$) oraz D17S1830 ($p=0,005$). Dla czterech mutacji *BRCA2* wyniki utrat markerów z chromosomu 13 nie wykazały żadnego związku.

Na podstawie porównania median CA 125 stwierdzono wyższe wartości CA 125 w grupie pacjentek z utratami markerów D17S1323 ($p=0,01$), D17S1880 ($p=0,004$) (Ryc.13) i D17S1861 ($p=0,006$) w porównaniu do pacjentek bez utrat. Tendencję do znamienności obserwowano dla markerów: D17S1584 ($p=0,07$), D17S953 ($p=0,07$), D17S1830 ($p=0,1$), D17S1811 ($p=0,1$).

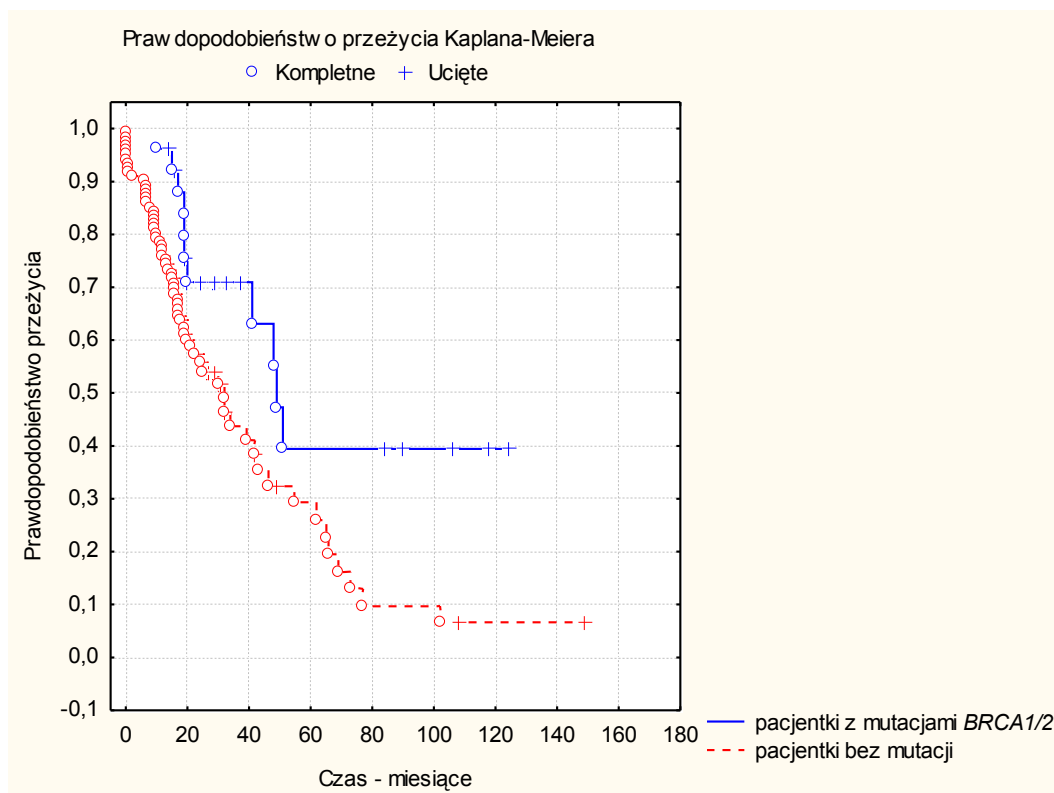


Rycina 13. Porównanie median stężenia CA 125 i próbek z utratami heterozygotyczności markera D17S1880 (grupa 1) oraz próbek bez utrat (grupa 0) ($p=0,004$).

Analiza dwóch grup pacjentek z wysokimi wartościami wyjściowego pomiaru CA 125 (>600 U/ml) i pozostałych z CA 125 powyżej normy wykazała zależność z obecnością utrat markerów: D17S1880 ($p=0,006$), D17S1861 ($p=0,04$). W grupie pacjentek z wyższą liczbą utrat (≥ 5) wśród markerów z chromosomu 17 również zaobserwowano zależność z wysokimi wartościami CA 125 ($p=0,03$).

Porównując wiek pacjentek z innymi zmiennymi testem U Manna-Whitney'a uzyskano znamienność statystyczną pomiędzy obecnością mutacji genów *BRCA1* i młodszym wiekiem pacjentek ($p=0,03$).

Analiza przeżyć wykazała, że znamienne dłużej przeżywały pacjentki z obecnością mutacji w genie *BRCA1* lub *BRCA2* ($p=0,00438$) (Ryc. 14). W przeciwieństwie do innych badanych markerów grupa z utratami D17S1861 również wykazała związek z dłuższą przeżywalnością ($p=0,01$).



Rycina 14. Prawdopodobieństwo przeżycia dla grup pacjentek z mutacjami germinalnymi genów *BRCA1/2* oraz pacjentek bez mutacji z użyciem testu log-rank ($p=0,00438$).

Nie stwierdzono statystycznych różnic w czasach przeżycia pacjentek z obecnością LOH lub nieobecnością utraty pozostałych analizowanych markerów, ani też w grupach z wysoką częstością utrat lub niską i brakiem zarówno dla markerów z chromosomu 17 jak i też 13. W analizie przeżycia modelem proporcjonalnego hazardu Coxa jako niezależne czynniki rokownicze potwierdzono wpływ FIGO ($p=0,0064$) oraz obecność mutacji *BRCA1/2* ($p=0,015$) na czas przeżycia. Na długość przeżycia nie miały wpływu takie parametry jak obecność LOH, *Grade*, postać histologiczna guza, stężenie Ca 125, wiek pacjentek czy wywiad rodzinny.

Wykorzystując regresję logistyczną sprawdzono, które ze zmiennych mają wpływ na wystąpienie mutacji *BRCA1/2*. W tej analizie uzyskano znamienność wyłącznie dla obecności obciążonego wywiadu rodzinnego u pacjentek z rakiem jajnika ($p=0,000018$). Nie uzyskano znamienności dla innych zmiennych: LOH analizowanych markerów, postaci histologicznej guza, *Grade*, FIGO i wieku.

Nie stwierdzono zależności statystycznych pomiędzy obecnością utrat heterozygotyczności analizowanych markerów a wiekiem, rozpoznaniem histologicznym, wywiadem rodzinnym oraz obecnością mutacji genu *BRCA2*.

7. DYSKUSJA

Pomimo iż, zjawisko utraty heterozygotyczności (LOH) wydaje się być częstym zjawiskiem w rakach nabłonkowych jajnika, wciąż jego znaczenie oraz funkcja rokownicza w tym nowotworze nie są poznane. Choć w teorii Knudsona LOH jest drugim etapem do inaktywacji obu alleli genu supresorowego, nie jest to jedyny mechanizm prowadzący do utraty funkcji supresorów [67, 191]. Badanie LOH umożliwia także mapowanie genów supresorowych (TSG) i poszukiwanie w wybranych regionach chromosomowych nowych genów kandydatów na supresory. Faktycznie w ten sposób zidentyfikowano różne geny supresorowe, np.: *CDKN2A* w czerniaku złośliwym (9p21) [28]. Zjawisko LOH występowało również w regionach chromosomowych, w których nie zidentyfikowano jak dotąd żadnych kandydatów na TSG. Potwierdza to wynik badania LOH w czterech markerach z chromosomu 15 i 16 w poniższej pracy, zlokalizowanych w regionach, w których nie opisywano potencjalnych lub znanych TSG. Jongsma A.P.M. i wsp. [82] porównywali wyniki utrat heterozygotyczności na chromosomach 13 i 15, na którym LOH stanowiły wyjściową wartość do oceny utrat z różnych regionów chromosomu 13. Uzyskali oni dla chromosomu 15 wartość 20% częstości utrat przy założeniu, że częstość utrat $\geq 50\%$ wskazuje na obecność genu o charakterze supresorowym, przy zachowaniu granicznej wartości retencji allela 50%. W przypadku obecnej pracy dla chromosomu 15 utrat uzyskano więcej, bo aż 36% w obu markerach, ale zastosowano łagodniejsze warunki oceny utraty, ponieważ już redukcja wysokości piku o 30% oznaczała utratę heterozygotyczności. Zaobserwowana wysoka częstość jednoczesnych utrat markerów z chromosomu 17 (≥ 5 – 37%) oraz z chromosomu 13q (≥ 4 – 33%) wraz z wysoką częstością utrat z chromosomu 15 i 16 sugeruje, iż w rakach nabłonkowych jajnika często tracone są duże fragmenty chromosomów. Potwierdzają to analizy cytogenetyczne prowadzone w rakach jajnika, gdzie uzyskiwano w większości bardzo złożone kariotypy z licznymi rearanżacjami [197, 85]. Potwierdzają to również inni badacze zajmujący się analizą LOH w rakach jajnika, którzy w swoich analizach stwierdzali występowanie w guzach zrównolicznych utrat markerów, a w badaniu cytogenetycznym monosomię chromosomu 17 [30, 45].

W przypadku analizy utrat poszczególnych markerów zlokalizowanych na chromosomie 17 nie uzyskałam szczególnie wysokich częstości dla markerów zlokalizowanych wewnątrzgenowo *BRCA1*. Wysokie częstości dotyczyły innych losowo wybieranych markerów: D17S1880 i D17S1811. W przypadku markera D17S1880 w jednej z ostatnich publikacji Maquire i wsp. [110], poprzez badanie CGH i LOH w połączeniu z danymi z *genome wide linkage scan* w rakach piersi wytypowali region zawierający potencjalne geny predyspozycji pomiędzy markerami D17S1880 i D17S1293. Co prawda, badanie 10 genów z wybranego fragmentu chromosomu 17 u członków rodzin wysokiego ryzyka zachorowania na raka piersi z wykluczonymi mutacjami genów *BRCA1/2* nie wykazało obecności mutacji w tych genach. Niemniej, autorzy postulują dalszą analizę molekularną chromosomu 17. Nie można wykluczyć, iż wysokie częstości LOH wybranych markerów mogą oznaczać sąsiedztwo potencjalnych genów supresorowych, ale mogą to być również przypadkowe zbieżności.

Wzrost liczby markerów mikrosatelitarnych o znanej lokalizacji w obrębie badanych regionów chromosomowych spowodował, że mapy utrat uzyskiwane dzięki analizie utrat alleli stają się coraz bardziej skomplikowane. Często też dla różnych nowotworów, a nawet dla podtypów tego samego nowotworu uzyskuje się różne wzory utrat. A więc na bazie zjawiska LOH, z wykorzystaniem np.: analizy mikromacierzy można klasyfikować poszczególne podtypy guzów. Takie rozróżnienie jest możliwe w przypadku locus 16q22 i utrat markerów obrębie genu E-kadheryny występujących w raku zrazikowym piersi, ale już nieobecnych w raku przewodowym piersi [28]. W badaniach CGH częstości utrat z chromosomów 13q, 17p i 17q są wysokie w rakach surowicznych (ponad 50%), co wyróżnia je spośród innych typów histologicznych raka jajnika [127]. W obecnej pracy nie stwierdzono zależności pomiędzy typem histologicznym guza, a obecnością utrat poszczególnych markerów lub ich grup, co może wynikać ze znacznej przewagi w badanej grupie raków nabłonkowych surowicznych w wysokim stadium zaawansowania. Jednocześnie mogło to zaważyć na ogólnej wysokiej częstości wykrywanych LOH.

W niniejszej pracy zaobserwowano istotny statystycznie związek pomiędzy LOH części markerów, a stopniem dojrzałości histologicznej guza.

Zjawisko to dotyczyło pięciu spośród ośmiu markerów z chromosomu 17 i dwóch z chromosomu 13. W pracy Pieretti i wsp. [141] z zastosowaniem innych markerów, częściowo opartych o analizę RFLP, uzyskano podobnie związek pomiędzy częstym występowaniem LOH, a wysokim G i FIGO w rakach nabłonkowych jajnika. A więc występowanie LOH na chromosomie 17 wydaje się towarzyszyć progresji guza, powodując gwałtowny rozwój wysoce złośliwego guza.

Związek pomiędzy stopniem FIGO a zjawiskiem LOH uzyskano zaledwie w przypadku jednego markera D13S260. Doniesienia na temat zależności zjawiska LOH i FIGO w rakach jajnika wykazują rozbieżne wyniki. W pracy Bozzetiego [16] na 23 sporadycznych guzach nabłonkowych 14% LOH było wykryte w guzach o wczesnym stopniu zaawansowania, a aż 44% w guzach o wysokim stopniu zaawansowania klinicznego. Najwyższą częstość utrat zaobserwowano w rakach surowicznych. W pracy Manderson i wsp. [108] dla badanych markerów z locus genu *BRCA1* wykazano również związek LOH z FIGO III i IV oraz z wysokim G. W niniejszej pracy nie wykazano zróżnicowania częstości utrat pomiędzy dwiema utworzonymi grupami: guzów surowicznych i pozostałych podtypów histologicznych. Nie udało się również wyróżnić osobno grupy raków śluzowych, których na 156 badanych przypadków było zaledwie 11. Niemniej wśród guzów z tym rozpoznaniem histopatologicznym nie znalazła się żadna z pacjentek z mutacją. W pracy na grupie 200 raków jajnika Werness i wsp. [192] podkreślili, że nie znaleźli mutacji *BRCA1* wśród swoich przypadków raków śluzowych (12 w porównaniu z 124 surowiczymi), co było zgodne z częścią obserwacji innych autorów [146].

Fakt, że w zasadzie w żadnej innej pracy z wykorzystaniem markera D17S260 w dostępnej literaturze nie opisano powiązania LOH z FIGO wydaje się tłumaczyć, że zaistniała zależność w mojej pracy jest przypadkowa. Nie stwierdzenie zależności pomiędzy utratami większej liczby markerów i FIGO może wskazywać, co było sugerowane przez innych autorów, że LOH jest wczesną zmianą. Utraty heterozygotyczności były obserwowane jako wczesne zmiany w *carcinoma in situ* wykrywanym przypadkowo u nosicielek mutacji *BRCA1*, które decydowały się na histerektomię i obustronną salpingooforektomię. Badacze sugerowali, iż

zarówno wysoka immunoreaktywność TP53 jak i też LOH z locus *BRCA1* znajdujące w naciekach podścieliska są jednym z pierwszych etapów kancerogenezy w raku jajnika i są wyznacznikiem inwazyjności guza [192]. Inni autorzy nie uzyskali zależności pomiędzy LOH, a stopniem FIGO czy G ani też z wiekiem pacjentek [82, 191]. Może to być tłumaczone, czego też nie można pominąć obecnie, że w badanej grupie przeważały raki surowicze w zaawansowanych stopniach rozwoju klinicznego (FIGO III i IV) [82].

Niespodziewany jest wynik statystycznie pozytywnej korelacji pomiędzy medianami wyjściowego stężenia CA 125 w grupie chorych z utratami markera D17S1323 (zlokalizowany w intronie 12 genu *BRCA1*), D17S1880 i D17S1861 (markery znajdujące się 3' i 5' blisko w stosunku do *BRCA1*: patrz tab. 6) oraz brakiem takiej korelacji dla pozostałych badanych markerów. Poziom CA 125, jak już to nadmieniono we wstępie, jest podwyższony w 75-90% przypadków raka jajnika i jest uznanym markerem, jeśli idzie o ocenę odpowiedzi na leczenie i wykrywanie wznowy [155]. Jest uwalniany z powierzchni komórek nowotworowych już we wczesnej fazie rozwoju guza, ale dopiero w zaawansowanych postaciach raka jego ilość znacznie wzrasta. Oznacza to, że stężenie CA 125 koreluje ze wzrostem stopnia FIGO [155, 185]. W przypadku zjawiska LOH wydawałoby się, że ewentualnym wytłumaczeniem zaistniałej korelacji jest związek LOH oraz stopnia zaawansowania histologicznego G. Co prawda, zaistniała korelacja nie dotyczy wszystkich markerów, których LOH były związane z wysokim stopniem G. Opisywano już wcześniej zależność między wyższym średnim poziomem CA 125 w surowicy chorych, a niskim stopniem zróżnicowania histologicznego [189, 23], aczkolwiek nie wszyscy autorzy potwierdzali tę obserwację [155]. Stopień zróżnicowania histologicznego G odpowiada za zmiany wysokości preoperacyjnego stężenia CA 125 w poszczególnych stopniach FIGO [18]. W przeprowadzonej ostatnio analizie wielośrodkowej dotyczącej raka jajnika w I stopniu FIGO w Australii na podstawie danych uzyskanych od 518 pacjentek zaobserwowano związek pomiędzy CA 125 powyżej 30 U/ml w surowicy a niższym stopniem G, FIGO IB lub IC, nieśluzowym typem raka i starszym wiekiem pacjentki [133]. Pojawiają się również próby połączenia oceny poziomu CA 125 w osoczu oraz innych czynników np.: stężenia DNA osoczowego i niezrównoważenia allelicznego

(AI) w celu uzyskania nowych testów diagnostycznych w raku jajnika [21]. Faktycznie, w przypadku kobiet z grupy wysokiego ryzyka raka jajnika - nosicielek mutacji *BRCA1/2*, jak dotąd jedynym narzędziem w monitorowaniu pojawienia się objawów choroby nowotworowej jajnika jest pomiar CA 125 oraz USG dopochwowe. Taka strategia badania przesiewowego jest jak dotąd jedyną możliwą do zastosowania w drugiej, znacznie liczniejszej grupie wysokiego ryzyka, mianowicie u kobiet w wieku pomenopauzalnym > 50 roku życia, które są narażone na występujące w 90% postaci sporadyczne raka jajnika. Obecnie trwają dwa duże badania grupy kobiet w wieku 54-74 lat, gdzie prospektywnie oceniane będą CA 125 i USG oraz ich wpływ na śmiertelność [32]. Badania przesiewowe ogólnej populacji obecnie nie są możliwe do przeprowadzenia. Natomiast w grupie kobiet nosicielek mutacji *BRCA1/2* w ramach poradnictwa istotnym jest udzielenie informacji o możliwości przeprowadzenia zabiegu usunięcia jajowodów i jajników [116].

Mimo iż oczekuje się, że zjawisko LOH powinno nieść ze sobą możliwość wybrania markerów niosących informację prognostyczną [14], w przypadku niniejszej pracy żaden z markerów, ani też poszczególne grupy markerów nie korelowały znamienne z obciążonym wywiadem u pacjentek. W niektórych doniesieniach zjawisko LOH było opisywane jako wyróżnik nosicielek mutacji w przypadku zaledwie dwojga chorych członków rodziny. W publikacji opisującej badania LOH siostr chorujących na raka piersi w Islandii, w której autorzy w tym celu wykorzystali między innymi markery D17S1323, D17S855 oraz D13S267, D13S171, D13S260 i D13S1246 uzyskano wysoki stopień predykcji dla pozytywnego wyniku mutacji [3]. Podobnie w pracy Geislera [52] w 221 próbkach raka jajnika, otrzewnej i jajowodu dokonano analizy LOH przy pomocy markerów D17S855, D17S1322 i D17S1323. W 121 próbkach z utratami (48%) i nieinformacyjnymi (6,8%) po przeprowadzeniu analizy mutacji przy pomocy techniki PTT, uzyskano 33 (27,3%) nieprawidłowych wyników i znaleziono po przesekwencjonowaniu 18 mutacji germinalnych i 15 somatycznych, co pozwoliło na stwierdzenie, że stosunek LOH/przypadki nieinformacyjne może służyć do selekcji próbek z mutacjami i zwiększa prawdopodobieństwo znalezienia mutacji z 23 do 37% w wyselekcjonowanej grupie przypadków. Pozytywny wywiad rodzinny jako wartość selekcji dał znacznie gorszy wynik,

gdyż pominięte zostały 20 z 33 wykrytych przypadków z mutacjami, gdzie w przypadku LOH nie został pominięty żaden. Zjawisko LOH nie pozwoliło na wyselekcjonowanie przypadków mutacji typu zmiany sensu oraz raków z bialleliczną metylacją promotora *BRCA1*, aczkolwiek mutacje *missense* w większości nie mają potwierzonego funkcjonalnego znaczenia, natomiast metylacja promotora nie wydaje się odgrywać znaczącej roli w przypadku dysfunkcji *BRCA1* [52].

W obecnej pracy uzyskano znamienność w przypadku porównania obecności utrat niektórych markerów z chromosomu 17 jak również wysokiej liczby utrat (≥ 5) i mutacji *BRCA1*. Ponieważ w przeprowadzonej analizie nie były to korelacje z markerami wewnątrzgenowymi *BRCA1*, tylko z innymi markerami, w których lokalizacjach nie opisano jak dotąd genów zaangażowanych w proces nowotworzenia, wynik ten wydaje się być przypadkowy. Znamienność ta nie utrzymała się w dalszej analizie wieloczynnikowej. Ocena utrat heterozygotyczności markerów wewnątrzgenowych *BRCA1* lub markerów flankujących *BRCA2* nie dała w analizie statystycznej wyników odbiegających od wyników uzyskanych dla pozostałych markerów z chromosomów 17 i 13q. Utrata heterozygotyczności może być efektem niestabilności genomu komórki rakowej i wczesną zmianą wtórną do pierwotnych, krytycznych zmian na poziomie molekularnym [28].

W przypadku chromosomu 13 utraty heterozygotyczności zlokalizowane w prążku 13q12-13 nie muszą dotyczyć locus *BRCA2*. Mogą dotyczyć innych genów w tym regionie, np.: *RB1*, który często ulega utratom w raku jajnika [46]. W przeprowadzonej przez nich analizie utrat z locus *BRCA2* z użyciem markerów D13S260, D13S171 i D13S267 wykazali w serii 85 nieselekcjonowanych guzów wysoką częstość utrat wynoszącą 46%. Autorzy tej pracy szukali jednocześnie mutacji somatycznych *BRCA2*, które wykryto zaledwie w dwóch przypadkach. Przy okazji znaleziono dwie mutacje germinalne, obie w obrębie eksonu 11 *BRCA2*, które w obrazie sekwencji wykazywały w guzie utraty linii dzikiej, podobnie jak w połowie przypadków w obecnej pracy. Również w innych doniesieniach autorzy rozważają istnienie innych genów supresorowych w bliskim sąsiedztwie genu *RB1* (13q14), a także w innych, ulegających częstym utratom regionach, 13q11, 13q21.1-3, 13q22-31, 13q32 i 13q32-4. W ostatnim z wymienionych znajduje się marker

D13S285, w którym najczęściej występowało zjawisko LOH w obecnej pracy [82].

Wyniki badań markerów mikrosatelitarnych wśród nosicieli mutacji *BRCA1* lub *BRCA2* w Polsce opublikował Górski i wsp. [58], którzy badali w 30 rodzinach, gdzie co najmniej trzech krewnych chorowało na raka piersi i lub jajnika, możliwość zastosowania analizy markerów satelitarnych do odróżnienia osób z konstytutywnymi mutacjami od zdrowych członków rodziny. W badaniu wykorzystano sześć polimorficznych markerów, z których cztery zostały użyte w mojej pracy i analizowano je w sposób porównywalny z zastosowanym w obecnej pracy u dwóch chorych członków z każdej rodziny. Badane były tzw. częste allele *BRCA1* i 2, aczkolwiek autorzy nie wyjaśniają, na jakiej podstawie oszacowano, które z alleli analizowanych STR są częste w Polsce i dlaczego częste allele tych markerów miałyby być związane z występowaniem mutacji genów *BRCA1* i 2, gdyż nie była to typowa analiza sprzężeń. Nie zostało podane, czy badani byli zdrowi członkowie rodzin, którzy nie okazali się być nosicielami mutacji. Na podstawie tej analizy wykluczono 8 par krewnych, natomiast w jednej z tych „wykluczonych” rodzin wykryto nosicielstwo mutacji 300T/G. Z kolei wśród 14 rodzin, u których nie wykazano mutacji typu *founder BRCA1* za pomocą eliminacji poprzez analizę alleli wykluczono zaledwie trzy rodziny. Choć w tekście autorzy dopuszczają tę metodę jako pomocną i obniżającą nieznacznie koszty analizy, to jednak tytuł publikacji podkreśla brak użyteczności takiego zastosowania markerów polimorficznych do wykrywania nosicieli mutacji *BRCA1/2* [58].

Często tracony w obecnej pracy flankujący *BRCA2* marker D13S171 [167, 45, 131], wcześniej był uważany za marker wewnątrzgenowy *BRCA2* [33]. Marker ten został w 2001 roku przypisany innemu, sąsiadującemu od strony telomeru genowi *APRIN (AS3)*, który ma być negatywnym regulatorem proliferacji komórkowej [49]. W literaturze przypisywano genowi *AS3* rolę potencjalnego genu supresorowego w rozwoju raka żołądka, wiążąc jego utratę z przerzutami tego nowotworu do węzłów chłonnych [66] oraz w komórkach raka prostaty [50], aczkolwiek brak nowszych doniesień potwierdzających ten związek. Niemniej część autorów w badaniach LOH nadal wykorzystuje w badaniach ten marker [58]. Nie można wykluczyć, że

wysoka częstość utrat odnotowana w tym markerze, częściowo jest związana z genem *AS3*, a nie z *BRCA2*. Geck [49] w swoim komentarzu sugerował, że szczególnie niska częstość mutacji *BRCA2* w niektórych pracach, np. Górskiego z 2000 i innych cytowanych autorów, to efekt obecności „zamaskowanego” przez obecność genu *BRCA2* innego genu supresorowego z jego bliskiego sąsiedztwa. Gen *AS3* i jego wewnątrzgenowy, jak ostatecznie zostało to udowodnione, marker D13S171, poprzez rolę w negatywnej regulacji proliferacji w komórkach raka prostaty wchodzi w spektrum raków związanych do tej pory z nosicielstwem mutacji *BRCA2*. Gen *AS3* może okazać się potencjalnym genem związanym z tzw. zespołem *BRCA2*, aczkolwiek brak doniesień na temat występowania mutacji w obrębie tego genu.

Rodzaje i częstość poszczególnych mutacji genów *BRCA1* i 2 wykryte w niniejsze pracy odbiegają od dotychczas podawanych w literaturze polskiej. W innych badaniach pochodzących z naszego ośrodka wśród 60 rodzin z wysokim ryzykiem dziedzicznej postaci raka piersi i/lub jajnika również przeważała mutacja 5382insC w eksonie 20 *BRCA1* (10%), ale kolejną najczęstszą mutacją była 300T/G (5%). Mutację 3819del5 wykryto tylko u jednej pacjentki z rakiem jajnika, natomiast w mojej pracy wystąpiła aż czterokrotnie [135]. Niemniej 3819del5 jest często wykrywaną mutacją w naszym ośrodku wśród pacjentów badanych z powodu obciążonego wywiadu rodzinnego dziedziczną postacią raka piersi i/lub jajnika. (Perkowska M. dane niepublikowane) Co prawda, w pracy Majdak i wsp. [105] dotyczącej innych przypadków raka jajnika z Kliniki Ginekologii, Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiety w Gdańsku nie znaleziono ani jednego przypadku mutacji 3189del5 [105]. W badaniach z ośrodka w Pomorskiej Akademii Medycznej przeprowadzonych w 200 rodzinach, wśród których 100 posiadało obciążony wywiad rodzinny w kierunku raka piersi i/lub jajnika wykryto w przeważającej liczbie mutacje 5382insC (34%), 300T/G (15,5%) oraz 4154delA (6%), natomiast 3189del5 wystąpiła w zaledwie 3 przypadkach [59]. Jedynie w pracy Jakubowskiej i wsp. na 21 badanych obciążonych rodzin w 10 wykrytych mutacjach 3189del5 wystąpiła dwa razy, 5382insC trzy razy, 300T/G tylko raz i 4154delA tylko raz [77]. Ponieważ praca Jakubowskiej pochodzi z tego samego ośrodka co Górskiego, nie

wiadomo, czy część przypadków w obu pracach nie pokrywa się. Z kolei w badaniu Grzybowskiej i wsp. w grupie 47 rodzin z obciążonym wywiadem nie znaleziono innych mutacji *BRCA1* niż 5382insC (11 przypadków) i 300T/G (1 przypadek) [64]. W pracy z Katedry Endokrynologii, Centrum Onkologii w Warszawie badanie SSCP genu *BRCA1* umożliwiło wykrycie tylko mutacji 5382insC i 185delAG wśród chorych z rakiem jajnika. Badanie to było ograniczone do przypadków z rodzinnym występowaniem raka jajnika [169]. W zasadzie, jeśli chodzi o inne grupy badane w Polsce to większość analiz prowadzona jest z zastosowaniem testu DNA (*multiplex PCR*) do wykrywania trzech często występujących w Polsce mutacji genu *BRCA1*: 5382insC, 300T/G, 4154delA. Nie wykonywano też analizy całego eksonu 11 tego genu [78, 79, 115]. Z tego względu trudno ocenić na ile obecny wynik wyróżnia badaną populację w stosunku do pozostałych regionów kraju. Wbrew oczekiwaniom, w obecnej pracy zaledwie jeden raz wykryta została mutacja założycielska 300T/G, co może również być związane z odmiennością badanej grupy, która dotyczyła nieselekcjonowanych chorych z rakiem jajnika.

Uzyskana w niniejszej pracy częstość mutacji germinalnych genów *BRCA1* i *BRCA2* w nieselekcjonowanej grupie pacjentek z rakiem jajnika (13,9%) jest jedną z wyższych w porównaniu z wynikami badań innych autorów, prowadzonymi zarówno w kraju, jak też na świecie. Najwyższe częstości mutacji germinalnych *BRCA1/2* stwierdzono w populacji Żydów Aszkenazyjskich (35,7-41%) [68, 118]. Poza naszą populacją (13,5%) [115] wysokie częstości w nieselekcjonowanych przypadkach raka jajnika podawano w Pakistanie (15,8%) [100], Kanadzie (11,7%) [152] oraz na Węgrzech (11%) [186]. W przypadku większości pozostałych badań częstość mutacji nie przekracza 10% [138]. Wydaje się, że w przypadku badań przesiewowych badanie całych genów poprzez sekwencjonowanie pełnych części kodujących genów oraz dużych rearanżacji genomowych *BRCA1* zwiększają tylko nieznacznie częstość wykrywanych mutacji. Dzięki tego rodzaju analizie genów *BRCA1* i 2 w jednej z ostatnio opublikowanych prac wykryto 15,3% mutacji germinalnych w grupie 209 inwazyjnych raków jajnika. Po wyłączeniu z tej grupy osób pochodzenia aszkenazyjskiego liczba wykrytych mutacji wynosi 14%, w czym znajdują się dwa przypadki osób

spokrewnionych [132]. O ile obecnie uważa się, że 5-13% spośród przypadków raka nabłonkowego jajnika jest wynikiem odziedziczenia mutacji w genie silnej predyspozycji do zachorowania na raka jajnika, to taka rozpiętość wynika z tego, że ogółem w populacjach nieaszkenazyjskich ryzyko ocenia się na 5%, a w aszkenazyjskiej na aż 20%. Niemniej spośród chorób nowotworowych dorosłych rak jajnika cechuje się najwyższą proporcją przypadków związanych z genami podatności [22]. W jednym z doniesień autorów ze Szwecji wykrywają oni zarówno dość wysoką liczbę mutacji (8% w grupie 161 raków jajnika), a także podkreślają, że ich wyniki oznaczają, że jedna na dziesięć chorych z rakiem jajnika jest nosicielką mutacji *BRCA1* i zachoruje po 50 roku życia [107].

W badaniu, które wcześniej było przeprowadzone w innym materiale nieselekconowanych raków jajnika z Instytutu Ginekologii i Położnictwa w Gdańsku wykryto mutacje genu *BRCA1* w 9% przypadków, choć badano całość sekwencji kodujących obu genów [105]. Różnica wydaje się wynikać z zupełnie innych metod przesiewowych analizy genów zastosowanych w tych badaniach. Podobnie znaczne zróżnicowania częstości wykrywanych mutacji pomiędzy poszczególnymi populacjami są zależne od czułości zastosowanych metod przesiewowych badania mutacji jak również od różnic etnicznych i obecności efektu założyciela.

Kontrowersyjna mutacja 4154delA określana jako założycielska dla populacji Polski, która w naszym ośrodku dotychczas nie była wykrywana, została w obecnym badaniu znaleziona u jednej pacjentki. Grupa wykrytych mutacji w niniejszej pracy jest jedną z liczniejszych w oparciu o prace podsumowujące dokonania różnych grup badawczych jak i najnowsze doniesienia [115, 132], a ponieważ badane były nieselekcjonowane przypadki raka jajnika, to nic nie wskazuje, aby mutacja 4154delA była trzecią z mutacji założycielskich, co jest proponowane przez autorów z Polski [57, 59]. Obserwacje w niniejszej pracy potwierdzają wyniki Grzybowskiej i wsp [64], którzy również nie wykryli obecności tej mutacji. Niedawno opublikowana praca Gronwalda i wsp. [62] sugeruje, iż ta mutacja może być mutacją założycielską na Litwie. Wykazała ona najwyższą częstość występowania (69%) spośród badanych testem *multiplex*-PCR 13 litewskich rodzin z wysoce (>60%) ryzyko wystąpienia mutacji) obciążonym wywiadem

rodzinnym [62]. Wysoka częstość nosicielstwa tej mutacji potwierdziła się również w innej pracy na nioselekcjonowanej grupie przypadków różnych nowotworów ginekologicznych, w tym raka jajnika, oraz raków piersi [183]. Być może różnice w częstości mutacji 4154delA wśród próbek pochodzących z naszego regionu i zachodniopomorskiego można tłumaczyć obecnością na terenach nadodrzańskich rodzin, które migrowały ze wschodnich terenów Polski w trakcie ruchów ludności po II Wojnie Światowej.

W niniejszej pracy jedną z mutacji genu *BRCA1* ze znalezionych w badaniu małej grupy osób z licznymi utratami z chromosomu 17 i bez utrat zmianą jest mutacja 1806C/T. Ogółem trzy mutacje w eksonie 11 genu *BRCA1* w tak nielicznej grupie zwracają uwagę na możliwość częstego występowania u pacjentek z rakiem jajnika innych niż wymieniane powyżej mutacje genu *BRCA1* uważane za założycielskie. Mutacja 1806C/T wystąpiła aż w dwóch przypadkach, w czym jeden z nich (nr 100) to guz, w którym nie znaleziono obecność utrat heterozygotyczności markerów z chromosomu 17. Pokazuje to raczej brak powiązań pomiędzy obecnością LOH wykorzystanych w pracy markerów i występowaniem mutacji *BRCA1*, gdyż mimo, że utraty heterozygotyczność dotyczyły większości nosicielek mutacji *BRCA1/2* w danej pracy, to również były często znajdowane wśród pozostałych przypadków. Mutacja 1806C/T jest mutacją założycielską w Szwecji [80] i może poprzez migracje ludności naszych krajów być znajdowana w populacji polskiej. Potwierdza to również zgłoszenie w bazie BIC, gdzie 1806C/T została między innymi odnotowana u osoby o pochodzeniu polskim [180]. Mutacja ta została również odnotowana w innych populacjach europejskich: w Hiszpanii i Czechach [162, 145]. Wskazane wydają się dalsze badania mające na celu określenie częstości występowania tej mutacji w naszej populacji oraz rozważenie, gdyby była ona odpowiednio częsta, o włączeniu jej do panelu analizowanych mutacji genu *BRCA1*. Znalezienie tej mutacji u pacjentki nr 161 z negatywnym wywiadem rodzinnym unaocznia, iż ograniczenie się wyłącznie do badania mutacji 5382insC, 300T/G i 4154delA może przyczynić się do pominięcia innych częstych w naszej populacji mutacji (3189del5, 185delAG), co potwierdziła Perkowska [135] oraz wyniki obecnej pracy.

Mutacja 3819del5 jest, podobnie jak mutacja 4154delA, mutacją często znajdowaną w sąsiadujących z Polską krajach. W publikacji Grudininy i wsp. [63] na populacji osób z St. Petersburga, autorka podaje jako najczęstsze dwie mutacje 5382insC oraz 3819del5, a także wymienia wśród znalezionych zmian molekularnych mutację 3875del4, która pojawiała się wśród ludności rosyjskiej z innych regionów kraju. 3819del5 (11,4% mutacji *BRCA1*) była również drugą co do częstości mutacją germinalną po 5382insC (51,4%) w pracy czeskich autorów. Podobnie w tej pracy u jednej z osób stwierdzono 3875del4, która jest często znajdowaną mutacją w populacji Centralnej Europy [145]. Mutacja 3819del5 na podstawie doniesień z poprzednich prac z naszego ośrodka oraz obecnych wyników powinna zdecydowanie znaleźć się wśród mutacji badanych w ramach podstawowego testu przesiewowego dla chorych z rakiem jajnika. Co do wykrytej jedynie u jednej pacjentki z grupy nieselekcjonowanych raków jajnika mutacji 185delAG to jako jedna z mutacji założycielskich wśród osób pochodzących od Żydów Aszkenazyjskich jest ona na tyle często znajdowana w populacji polskiej [169], że być może przewyższa swoją częstością mutację 300T/G wśród rodzin z obciążonym wywiadem (Perkowska M. dane niepublikowane).

Natomiast stwierdzona w obecnej pracy korelacja występowania mutacji *BRCA1* z młodszym wiekiem pacjentek była już wcześniej poruszana przez innych autorów. Tak w przypadku nosicielek mutacji genu *BRCA1* zachorowanie na raka jajnika przypada na średnio 5-10 lat młodszy wiek w porównaniu z pacjentkami ze sporadycznymi postaciami raka jajnika [132, 152]. W mojej pracy średni wiek zachorowania na raka jajnika w przypadku nosicielki *BRCA1* wynosił 50,95 lat, natomiast przypadków bez stwierdzonej mutacji 57,44 lat. W piśmiennictwie raki jajnika związane z nosicielstwem mutacji genu *BRCA2* nie wykazują takiej różnicy w czasie zachorowania. Podobny wynik otrzymano w trakcie obecnych obliczeń (60,5 lat), choć może on być mało wiarygodny, gdyż uzyskany w grupie zaledwie czterech przypadków. Niewielka różnica wieku w przypadku nosicielek mutacji *BRCA1* i podawany w literaturze identyczny jak w przypadkach sporadycznych wiek zachorowania na raka jajnika u nosicielek *BRCA2* wskazuje, że starszy wiek (> 50 lat) nie powinien być w przypadku raka jajnika dyskwalifikującym do badania molekularnego tych dwóch genów.

W grupie pacjentek z germinálną mutacją genów *BRCA* odnotowano zachorowanie na raka jajnika u jednej z pacjentek (255) w wieku aż 78 lat z obciążonym wywiadem rodzinnym. Inną pacjentką w starszym wieku jest chora nr 93 (76 lat), gdzie niestety nie jest znany wywiad. W przypadku starszych pacjentek często pomija się fakt, iż zachorowanie na raka może mieć podłoże dziedziczne, a podawana w większości literatury penetracja genów *BRCA1* i *2* sięga do 70-75 roku życia. Nosiciel mutacji w genach *BRCA* może dożyć wieku 80 i więcej lat, i nie zachorować na żadną z chorób nowotworowych ze spektrum zespołów *BRCA*. Natomiast w analizie rodowodowej osoba taka będzie informatywnym krewnym, który wymaga, podobnie jak młodsze pacjentki diagnostyki molekularnej [104]. W przypadku modeli obliczających prawdopodobieństwo znalezienia mutacji w genach *BRCA1/2*, które zostały wyliczone na podstawie korelacji fenotypowo-genotypowych pomiędzy osobami będącymi nosicielami takich mutacji, dochodzi do zaniżania ryzyka mutacji w przypadkach wyłącznie raka jajnika u osób w starszym wieku (program komputerowy BRCAPRO), w której to grupie też spotyka się nosicieli [22].

W poniższej pracy odnotowano statystyczne różnice w przeżyciach pomiędzy grupą nosicielek mutacji, a pozostałymi pacjentkami z rakiem jajnika ($p=0,0079$), gdzie dłuższe przeżycia zaobserwowano u nosicielek mutacji germinálnych genów *BRCA1* i *2*. Jedynym, prawdopodobnie losowo korelującym z przeżyciami w analizie log-rank markerem mikrosatelitarnym był D17S1861. Korelacja nie potwierdziła się w dalszych obliczeniach, gdzie jedynymi niezależnymi czynnikami wpływającymi na długość przeżycia okazały się obecność mutacji *BRCA1/2* oraz stopień FIGO. W literaturze istnieją sprzeczne doniesienia na temat korelacji obecności mutacji *BRCA1/2* i dłuższych przeżyć tych pacjentek z rakiem jajnika, które przedstawione zostały w pracy przeglądowej [138]. W pracy Ben Davida Y. i wsp. [9] również obserwowano dłuższe przeżycia nosicielek mutacji *BRCA*, niezależnie od wieku, stopnia FIGO i wywiadu rodzinnego. Autorzy podkreślali, że nie jest to wynikiem wczesnej wykrywalności choroby nowotworowej wśród nosicielek. Przytoczono również dwa prawdopodobne mechanizmy powstania tego zjawiska zaproponowane przez Boyd i wsp. [15], według których inny przebieg kliniczny choroby nowotworowej wynika z niskiej częstości

podziałów komórkowych guza oraz lepszej odpowiedzi na chemioterapię [9]. W przypadku dziedzicznego raka piersi sytuacja nie jest w pełni jasna, część autorów jak przytaczana we wstępie Querzoli [148] podają gorsze rokowanie dla nosicielek mutacji *BRCA1*, ale istnieją również prace, gdzie uzyskano odwrotne wyniki. Część nosicielek mutacji *BRCA1/2* może nie być kwalifikowana do badań genetycznych z powodu wcześniejszego zgonu, gdyż guzy nosicielek są bardziej agresywne niż kontroli sporadycznych [96]. Autorzy El-Tamer M. i wsp. [38] sugerują, że przyczyną mogą być badania prowadzone w poradniach genetycznych, gdzie preferencyjnie włączane są do badań kobiety, które żyją i wyraziły zgodę na badania, w przeciwieństwie do kobiet, które zmarły przed wykonaniem badania. Ominięcie tego stanu rzeczy wymaga albo prowadzenia badań prospektywnych w nieselekcjonowanych grupach pacjentek, albo wykorzystania nieselekcjonowanych próbek tkanek archiwizowanych podczas zabiegów operacyjnych w badaniach retrospektywnych [38]. W mojej pracy udało się w przypadku ogromnej większości pacjentek zebrać grupę nieselekcjonowanych przypadków, aczkolwiek zaledwie część pacjentek (26) była obserwowana trzy lata i więcej. Należy również podkreślić, że w celu uzyskania wystarczającej do analizy statystycznej liczby przypadków z mutacją w populacji z nawet tak licznymi odnotowanymi w innych badaniach częstościami wykrywanych mutacji wśród chorych na raka piersi i/lub jajnika należy zebrać materiał od średnio około 200 osób, co mimo wzrastającej liczby zachorowań na raka jajnika w Polsce jest trudne ze względów organizacyjnych.

Wśród znalezionych w niniejszej pracy czterech zmian w genie *BRCA2* powodujących skrócenie białka, jedna z mutacji: 4451delA nie została dotąd opisana w literaturze, jak również nie wymienia jej baza BIC [180]. Spośród pozostałych trzech mutacji również 4668T/G oraz 6621del4 nie są odnotowane w BIC, ale są wymieniane w publikacjach dotyczących badań genu *BRCA2* w Polsce [93, 102]. Wykrycie czterech przypadków mutacji genu *BRCA2* w stosunku do 17 przypadków mutacji *BRCA1* potwierdza przypuszczenie, że mutacje *BRCA2* stanowią w naszej populacji mały odsetek wśród dziedzicznych przypadków raka piersi i/lub jajnika. Podobnie w pracy Perkowskiej i wsp. [135] z naszego ośrodka, mutacje

BRCA2 występowały znacznie rzadziej niż w *BRCA1* i żadna z nich (4008delA, 7985G/A) nie powtórzyła się w badanej grupie. Także w pracy Górskiego wykryto zaledwie 7 przypadków mutacji *BRCA2* w stosunku do 122 mutacji *BRCA1* i wśród nich dwie znajdowały się w eksonie 11, natomiast pozostałe były rozrzucone w innych regionach genu [59]. W pracy Grzybowskiej jedna mutacja: 9631delC powtórzyła się aż trzykrotnie, ale sama autorka pracy przyznaje, że nie wydaje się, aby badana grupa 47 rodzin z predyspozycją do dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika z górnego Śląsku była reprezentatywna dla populacji polskiej [64]. Niewykluczone jest rodziny ze zdiagnozowaną 9631delC łączy wspólne pochodzenie, niemniej w badaniach w naszym ośrodku gdzie badano całość sekwencji kodującej *BRCA2* nie wykryto jej. Była natomiast wśród wyników badania mutacji w pracy Górskiego z 2004, ale ponieważ w pracy tej część przypadków to pacjenci z innych ośrodków genetycznych w kraju, być może ten akurat pacjent pochodził z ośrodka z Gliwic.

Wykryty w przypadku nr 709 w poniższej pracy wariant D596H ze względu na jednokrotne wystąpienie oraz na szczególnie młody wiek (24 lata) pacjentki wydaje się być interesującym materiałem do dalszych badań. Zmiana ta należy do powiększającej się wciąż grupy tzw. nieznanymi wariantów (UV), które są często opisywane w zarówno *BRCA1* (jedna trzecia zgłoszeń BIC) jak i *BRCA2* (połowa zgłoszeń BIC), które zazwyczaj są mutacjami *missense* lub delecjami w ramce odczytu i nie jest znany ich wpływ na funkcjonalność białka [180]. W pracy Gómez-Garcia podaje [56], że w grupie 16 osób z oznaczonymi UV w genach *BRCA1/2* przeprowadzone badania kosegregacji w trzech rodzinach, ponieważ tylko one kwalifikowały się do badań, wykazały kosegregację zmiany genetycznej z chorobą. W rodzinach osób, u których odnotowano zmianę UV rzadziej występują krewni z podobną zmianą oraz krewni, którzy przebyli chorobę nowotworową w porównaniu z rodzinami osób z mutacjami typu skracających produkt białkowy. Możliwe, że część nieznanymi wariantów jest również zmianami patogenicznymi, ale o niższej penetracji, co tłumaczyć może właśnie rodzaj zmiany genetycznej – jedynie mutacja punktowa. Programy do oceny ryzyka wystąpienia patogenicznej mutacji (BRCAPro, Myriad II) również wykazują niższe prawdopodobieństwa w wybranych UV niż w przypadku mutacji o

patogennym charakterze, aczkolwiek są one znamienne inne niż dla części tzw.: „neutralnych” UV [56].

W innej pracy poświęconej nieznanym wariantom obu genów autorzy podkreślają znaczenie multidyscyplinarnego podejścia do klasyfikacji UV i włączenia analizy LOH jako kolejnej składowej w modelu, który może pozwolić na odróżnienie zmiany istotnej klinicznie dla pacjenta i jego rodziny od nieistotnej, ponieważ odnotowywano różnice w wysokości częstości utrat pomiędzy guzami osób z mutacją i bez mutacji, jak również zawsze utratę allela prawidłowego [55]. Nie jest to jedyne doniesienie, w którym autorzy powołują się na zjawisko LOH, jako potwierdzające patogenność zmiany odnotowanej na razie jako nieznaną wariant [113, 130]. W niniejszej pracy uzyskano zależność pomiędzy obecnością utrat a nosicielstwem mutacji dla części markerów z chromosomu 17, natomiast taka zależność nie dotyczyła markerów z chromosomu 13, gdzie wykryto nieznaną warianty, co wynika najpewniej ze zbyt małej liczby przypadków mutacji *BRCA2*. Ponadto w próbie 225, gdzie guz pochodził z preparatu parafinowego, a pacjentka miała znaną mutację 3376T/A, w obrazie sekwencji DNA z guza w fragmencie eksonu 11 genu *BRCA1* uzyskano prawidłowy wynik sekwencjonowania, a więc uwidoczono utratę allela z mutacją. Nie odnotowano tego typu zjawiska w literaturze poświęconej analizie mutacji i utratom alleli w rakach piersi lub jajnika z wyjątkiem przypadku podwójnej heterozygoty pod względem mutacji *BRCA1* i 2, gdzie selektywnie dochodziło do utrat, również allela z mutacją [8]. Natomiast opisano przypadek nosicielki mutacji *BRCA2*, gdzie jednym z pierwotnych nowotworów, które u niej wystąpiły był rak płuc, którego analiza LOH wykazała retencję allela prawidłowego w tkance guza. Zjawisko to można tłumaczyć faktem, iż dla rozwoju raka płuc mutacja *BRCA2* nie jest istotną zmianą genetyczną [13]. Dlaczego akurat w przypadku naszej pacjentki z mutacją 3376T/A utracony został allel z mutacją jest trudnym pytaniem i przypadek ten wymaga dalszych badań. Można przypuszczać, że również u tej pacjentki z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku HBOC występuje dodatkowa mutacja, gdzie w przypadkach rzadkich podwójnych heterozygot genów *BRCA1* i 2 różne zaburzenia genomu guza mogą dawać

zróznicowany obraz utrat i zakłócać szlaki przemian białkowych w komórkach.

Należy zauważyć, że w grupie pacjentek, u których nie zdiagnozowano mutacji, nadal znajdują się osoby, u których stwierdzono pozytywny wywiad rodzinny (19 przypadków). Podobną proporcję chorych z pozytywnym wywiadem oraz rakiem jajnika i wykrytą mutacją *BRCA1/2* oraz bez stwierdzonej mutacji podawali inni autorzy [52]. Nie można wykluczyć, czy nie pominięto, ze względu na badanie jedynie wybranych regionów obu genów, innych mutacji o charakterze patogennym. W ocenie ryzyka zachorowania na raka jajnika, gdy analiza była ograniczona do badania rodzin, gdzie nie wykryto mutacji *BRCA1/2*, ryzyko powtórzenia się raka jajnika wynosi 11,6 i jest bardzo zbliżone do tego dla rodzin nosicieli mutacji, które wynosi 11,9. Może to oznaczać, że również wśród tych rodzin albo występują nie wykryte mutacje *BRCA1/2*, albo inne czynniki genetyczne, np.: mutacje w innych genach zwiększające ryzyko u kobiet, u których nie wykryto mutacji genów *BRCA1/2* [22].

Ponieważ w publikacjach z terenu Polski dotyczących badań genów *BRCA* uzyskiwane są wysokie częstości mutacji germinalnych *BRCA1*, co potwierdziło się w obecnych wynikach, wydaje się wskazane aby u każdej chorej na raka jajnika niezależnie od wywiadu rodzinnego i wieku wykonać podstawowy panel badań pięciu mutacji *BRCA1* proponowany w niniejszej pracy. Opierając się na korelacjach, które uzyskiwali inni autorzy, gdzie przeważały mutacje w rakach surowicznych, badane powinny być w pierwszej kolejności pacjentki z postaciami nieśluzowymi guzami raka jajnika.

Wykrycie ogółem trzech mutacji w rozszerzonym badaniu eksonu 11 *BRCA1*, choć mogło być losowe, wskazuje możliwość rozszerzenia badania genetycznego dla osób z rakiem jajnika, u których nie wykryto mutacji 5382insC, 3819del5, 300T/G, 185delAG, 4154delA, o kolejne fragmenty eksonu 11. Jeśli nie oferować tego wszystkim pacjentkom, to przynajmniej tym z obciążonym wywiadem rodzinnym.

Przeprowadzona analiza utrat heterozygotyczności użytych w pracy markerów nie potwierdziła znaczenia zjawiska LOH jako niezależnego czynnika rokowniczego w przebiegu raka jajnika. W badanej populacji utraty heterozygotyczności wykorzystanych markerów nie wiązały się w analizie

wieloczynnikowej w sposób znamieny z występowaniem mutacji germinalnych genów *BRCA1/2*. Zaistniałe korelacje w analizie jednoczynnikowej wydają się być przypadkowe i mogą być wynikiem licznych przemian genomu guza o agresywnym charakterze wzrostu.

8. WNIOSKI

1. Wyniki analizy utrat heterozygotyczności (LOH) markerów zlokalizowanych w chromosomach 13 i 17 wskazują na częste delecje dużych fragmentów tych chromosomów w raku jajnika, co potwierdza zjawisko złożonych rearanżacji chromosomowych opisywanych w tym nowotworze.
2. Zaobserwowany związek pomiędzy wzrostem częstości LOH niektórych markerów a niskim stopniem dojrzałości histologicznej raka wskazuje, że progresja guza złośliwego jest związana ze zjawiskiem utraty heterozygotyczności.
3. Pozytywna korelacja pomiędzy wysokimi wartościami wyjściowego stężenia CA 125 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika a wysoką częstością LOH niektórych markerów w ich guzach, uzupełnia opisywaną zależność pomiędzy stopniem dojrzałości histologicznej guza (G) i stężeniem CA 125.
4. Nie potwierdza się znaczenia LOH analizowanych markerów jako czynnika rokowniczego w przebiegu raka jajnika lub też jako czynnika wskazującego na występowanie mutacji genów *BRCA1/2*.
5. Znamienne dłuższy czas przeżycia pacjentek z rakiem jajnika i obecnością germinalnej mutacji w genie *BRCA1* lub *BRCA2* ($p=0,0079$) jest zgodny z obserwacjami innych autorów.
6. Rodzaje i wysoka częstość określonych germinalnych mutacji genów *BRCA1* i *2* (13,9%) wykrytych w niniejszej pracy odbiegają od większości badań europejskich (5-10%), co może wynikać z różnic w doborze grupy chorych z rakiem jajnika oraz czułości zastosowanych metod wykrywania mutacji. Różnice te są także związane z odmiennym spektrum mutacji założycielskich w poszczególnych populacjach.

7. Ponieważ ponad 70% wszystkich mutacji genu *BRCA1* stanowiły 5382insC, 3819del5, 300T/G, 185delAG i 4154delA, należy rozważyć potrzebę wykonywania badania tych zmian u wszystkich chorych na postacię nieśluzowe raka jajnika, niezależnie od wieku i wywiadu rodzinnego.

8. Wysoka częstość mutacji w obrębie eksonu 11 genu *BRCA1* wykryta wśród losowo wybranych pacjentek z rakiem jajnika uzasadnia rozszerzenie rutynowego badania panelu najczęstszych mutacji tego genu o analizę całego eksonu 11 u chorych z rakiem jajnika i z pozytywnym wywiadem rodzinnym.

9. STRESZCZENIE

Celem rozprawy było przeprowadzenie analizy częstości występowania LOH wybranych polimorficznych markerów mikrosatelitarnych z chromosomów 17 i 13 z uwzględnieniem loci genów *BRCA1* i *BRCA2* w grupie nieselekcjonowanych przypadków raka jajnika. W badanej grupie kobiet postanowiono równocześnie określić częstości występowania wybranych mutacji germinalnych (konstytucyjnych) genów *BRCA1* i *BRCA2*. Celem podsumowującym było określenie związku pomiędzy występowaniem zjawiska LOH w guzie nowotworowym a wybranymi parametrami histopatologicznymi i klinicznymi z uwzględnieniem podziału pacjentek na dwie grupy: z mutacjami germinalnymi genów *BRCA1/2* oraz bez tych mutacji.

Materiał do badań stanowiło 151 nieselekcjonowanych pacjentek z rozpoznaniem raka jajnika operowanych w Klinice Ginekologii Instytutu Położnictwa i Chorób Kobietych AM w Gdańsku w okresie 1992-2004. DNA izolowano z mrożonych fragmentów guzów nowotworowych oraz krwi obwodowej. Analizowano następujące dane kliniczne chorych: wiek, postać histologiczną guza, FIGO, stopień złośliwości histologicznej oraz wywiad rodzinny.

Do badań utraty heterozygotyczności wybrano 15 wysoce polimorficznych markerów mikrosatelitarnych (VNTR) występujących w chromosomach 17p, 17q i 13q ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji genów *BRCA1* i *BRCA2*. Aby sprawdzić, czy w badanej grupie zjawisko LOH jest ograniczone do chromosomów 13 i 17, dodatkowo zbadano cztery markery z chromosomów 15 i 16, które są zbliżone wielkością do chromosomów 13 i 17. Po przeprowadzeniu reakcji PCR w zoptymalizowanych warunkach dla każdego fragmentu DNA, uzyskane produkty poddawano elektroforezie kapilarnej i dalszej analizie w systemie ABI PRISM 310 z oprogramowaniem GENESCAN. Allele były porównywane w parach DNA z krwi obwodowej/DNA z guza tej samej osoby.

Zjawisko LOH markerów z chromosomu 17 wykryto w 501 spośród 925 informacyjnych przypadków (54%). Najczęściej ulegały utracie markery D17S1880 (58%) i D17S1811 (57%). Dwa markery położone w intronie 12

BRCA1 D17S1323 oraz w intronie 20 D17S855 były tracone odpowiednio w 47% oraz 53% przypadków. Utraty czterech i więcej markerów z chromosomu 17 zaobserwowano w 75 guzach (48%).

Utraty heterozygotyczności na chromosomie 13q odnotowano w 370 przypadkach spośród 828 (45%). Najczęściej ulegał utratom marker D13S171 (51%), który leży 13-qter w stosunku do *BRCA2*. Drugi w kolejności tracony był marker D13S285 (48%). Utraty co najmniej czterech markerów z 13q wykazano w 52 guzach (33%).

W przypadku chromosomu 15 utraty obserwowano w 36% natomiast z chromosomu 16 w 24% próbek.

W badanej grupie chorych poszukiwano najczęściej występujących w Polsce mutacji germinalnych w genie *BRCA1*. Były to mutacje założycielskie 5382insC, 300T/G i 4154delA. Badano także 185delAG w eksonie 2 i 3819del5 w eksonie 11, które od lat powtarzają się u pacjentów z regionu gdańskiego. Mutacji 5382insC, 185delAG, 3819del5 i 4154delA szukano z użyciem techniki denaturacyjnej chromatografii wysokociśnieniowej (DHPLC).

Aby sprawdzić, czy analiza wybranych mutacji pokrywa spektrum wszystkich mutacji w genie *BRCA1*, u pacjentek z rakiem jajnika, rozszerzono badanie tego genu. Spośród pozostałej grupy sporadycznych przypadków wybrano losowo 10 próbek z wysoką częstością utrat (≥ 4) z chromosomu 17 i 10 bez utrat. Próbkę z/bez LOH z chromosomu 17 przebadano z użyciem DHPLC w obrębie całego eksonu 11.

Zdecydowano się także na badanie całych eksonów 10 i 11 genu *BRCA2* techniką DHPLC, gdyż zaobserwowano podwyższoną częstość mutacji germinalnych w obrębie regionu OCCR tego genu u chorych na raka jajnika.

Wśród 151 nieselekcjonowanych chorych kobiet na raka jajnika wykryto germinalne mutacje genów *BRCA1* i 2 u 21 chorych (13,9%), w tym mutacje *BRCA1* stanowiły 81%, a mutacje *BRCA2* 19%. W genie *BRCA1* najczęściej znajdowaną mutacją była 5382insC (4%), natomiast kolejną co do częstości występowania była 3819del5 (3%). Wśród znalezionych mutacji dwukrotnie wystąpiła 1806C/T (1,3%). Sekwencjonowanie ujawniło częstą

utrata alleli prawidłowych w DNA z guza u nosicielek mutacji germinalnych, co potwierdza teorię Knudsona.

Wyniki analizy utrat heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w chromosomach 13 i 17 wskazują na częste delecje dużych fragmentów tych chromosomów w raku jajnika, co potwierdza zjawisko złożonych rearanżacji chromosomowych opisywanych w tym nowotworze. Zaobserwowany związek pomiędzy wzrostem częstości LOH części markerów a niskim stopniem dojrzałości histologicznej raka wskazuje, że progresja guza złośliwego jest związana ze zjawiskiem utraty heterozygotyczności. Pozytywna korelacja pomiędzy wysokimi wartościami wyjściowego stężenia CA 125 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika a licznymi LOH wybranych markerów w ich guzach, uzupełnia opisywaną zależność pomiędzy G i stężeniem CA 125.

Uzyskane zależności pomiędzy obecnością LOH niektórych markerów z chromosomu 17 i występowaniem mutacji *BRCA1* wskazują na przypadkowe statystycznie znamienneści, które mogą mieć swoje wytłumaczenie w złożonych aberracjach chromosomowych w guzach o niskim stopniu dojrzałości histologicznej. W przypadku markerów użytych w pracy nie potwierdzono opinii niektórych autorów sugerujących znaczenie LOH jako czynnika rokowniczego w przebiegu choroby nowotworowej lub też wskazującego na występowanie mutacji germinalnych genów *BRCA1/2*.

Rodzaje i wysoka częstość określonych germinalnych mutacji genów *BRCA1* i 2 (13,9%) wykrytych w niniejszej pracy odbiegają od większości badań europejskich (5-10%), co może wynikać z różnic w doborze grupy chorych z rakiem jajnika oraz czułości zastosowanych metod wykrywania mutacji. Różnice te są także związane z odmiennym spektrum mutacji założeńskich w poszczególnych populacjach.

Ponieważ ponad 70% wszystkich mutacji genu *BRCA1* stanowiły 5382insC, 3819del5, 300T/G, 185delAG i 4154delA, należy rozważyć potrzebę wykonywania badania tych zmian u wszystkich chorych na postacie nieśluzowe raka jajnika, niezależnie od wieku i wywiadu rodzinnego.

Wysoka częstość mutacji w obrębie eksonu 11 genu *BRCA1* wykryta wśród losowo wybranych pacjentek z rakiem jajnika uzasadnia rozszerzenie rutynowego panelu najczęstszych mutacji tego genu o badanie całego eksonu 11 u chorych z rakiem jajnika i z pozytywnym wywiadem rodzinnym.

10. PIŚMIENICTWO

1. Abdollahi A., Pisarcik D., Roberts D., Weinstein J., Cairns P., Hamilton T.C.: LOT1 (PLAGL1/ZAC1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer. *J Biol Chem* 2003; 278:6041-9.
2. Allan G.J., Cottrell S., Trowsdale J., Foulkes W.D.: Loss of heterozygosity on chromosome 5 in sporadic ovarian carcinoma is a late event and is not associated with mutations in APC at 5q21-22. *Hum Mutat* 1994;3:283-91.
3. Arason A., Jonasdottir A., Barkardottir R.B., Bergthorsson J.T., Teare M.D., Easton D.F., Egilsson V.: A population study of mutations and LOH at breast cancer gene loci in tumours from sister pairs: two recurrent mutations seem to account for all BRCA1/BRCA2 linked breast cancer in Iceland. *J Med Genet* 1998; 35:446-449.
4. Auersperg N., Wong A.S., Choi K.C., Kang S.K., Leung P.C.: Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001;22: 255-88.
5. Averette H.E., Janicek M.F., Menck H.R.: 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. Bali A., O'Brien F.M., Edwards L.S., Sutherland R.L., Hacker N.F., Henshell S.M.: Cyclin D1, p53, and p21 Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5168-5177.
7. Bast R.C.: Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol* 2003; 21: 200-205.
8. Bell D.W., Erban J., Sgroi D.C., Haber D.A.: Selective loss of heterozygosity in multiple breast cancers from a carrier of mutations in both BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 2002; 62: 2741-3.
9. Ben David Y., Chetrit A., Hirsh-Yechezkel G., Friedman E., Beck B.D., Beller U., Ben-Baruch G., Fishman A., Levavi H., Lubin F., Menczer J., Piura B., Struewing J.P., Modan B.: Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J Clin Oncol* 2005; 20: 463-466.
10. Berchuck A., Heron K., Carney M.E., Lancaster J.M., Fraser E.G., Vinson V.L., Deffenbaugh A.M., Miron A., Marks J.R., Futreal P.A.,

- Frank T.S.: Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2433-2437.
11. Berkenblit A., Cannistra S.A.: Advances in the management of epithelial ovarian cancer.: *J Reprod Med* 2005; 50: 426-438.
 12. Bertwistle D., Ashworth A.: Functions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:14-20.
 13. Boettger M., Sergi C., Meyer P.: *BRCA1/2* mutation screening and LOH analysis of lung adenocarcinoma tissue in a multiple-cancer patient with a strong family history of breast cancer. *J Carcinog* 2003; 2: 5.
 14. Bósz P., Bast R.C., Berchuck A., Burke H.B., Buller R.E., Creasman W.T., Dubeau L., Fox H., Geisler H.E., Geisler J.P., Henson D.E., Rustin G.J., Vermorken J.B., Wells M., Wilbanks G.D.: Consensus statements on prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma. Report of the Consensus Meeting organized by the European Society of Gynaecological Oncology, ESGO. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 21:513-526.
 15. Boyd J., Sonoda Y., Federici M.G., Bogomolny F., Rhei E., Maresco D.L., Saigo P.E., Almadrones L.A. Barakat R.R., Brown C.L., Chi D.S., Curtin J.P., Poynor E.A., Hoskins W.J.: Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA* 2000; 283: 2260-2265.
 16. Bozzetti C., Bortesi B., Merisio C.: Loss of heterozygosity (LOH) in ovarian cancer. *Int J Gynecol Obstet* 2004; 85: 294-295.
 17. Bręborowicz J., Bręborowicz D., *Patologia nowotworów jajnika wywodzących się z nabłonka pokrywającego i z podścieliska*. 771-781 (w:) Markowska J. (red.): *Onkologia Ginekologiczna*, Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2002.
 18. But I., Gorisek B.: Preoperative value of CA 125 as a reflection of tumor grade in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 63: 166-172.
 19. Camilleri-Broët S., Hardy-Bessard A.C., 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.
 20. Cass I., Baldwin R.L., Varkey T., Moslehi R., Narod S.A., Karlan B.Y.: Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 2187-2195.

21. Chang H.W., Lee S.M., Goodman S.N., Singer G., Cho S.K., Sokoli L.J., Montz F.J., Roden R., Zhang Z., Chan D.W., Kurman R.J., Shih I.M.: Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1697-1703.
22. Chappuis P.O. i Foulkes W.D., Overview of the clinical genetics of ovarian cancer. 43-72 (w:) Morrison P.J., Hodgson S.V., Haites N.E. (red.): *Familial breast and ovarian cancer. Genetics, screening and management.*, 2002 Cambridge University Press.
23. Cooper B.C., Sood A.K., Davis C.S., Ritchie J.M., Sorosky J.I., Anderson B., Buller R.E.: Preoperative CA 125 levels: an independent prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 59-64.
24. Cramer D.W., Welch W.R., Cassels S., Scully R.: Mumps, menarche, menopause and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 1-6.
25. Cvetkovic D.: Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 68.
26. de Jong M.M., Nolte I.M., te Meerman G.J., van der Graff W.T.A i inni.: Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med. Genet* 2002; 39:225-242.
27. de la Chapelle A.: Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 769-780.
28. Devilee P., Cleton-Jansen A.M., Cornelisse C.J.: Ever since Knudson. *Trends in Genetics* 2001; 10: 569-573.
29. Di Cristofano A., Pandolfi P.P.: The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000; 100: 387-90.
30. Dion F., Mes-Masson A.M., Seymour R.J., Provencher D., Tonin P.N.: Allelotyping defines minimal imbalance at chromosomal region 17q25 in non-serous epithelial ovarian cancers. *Oncogene* 2000; 19: 1466-72.
31. 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: 46-52.
32. Duffy M.J., Bonfref J.M., Kulpa J., Rustin G.J.S., Soletormos G., Torre G.C., Tuxen M.K., Zwirner M.: CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 679-691.

33. Edwards S.M., Dunsmuir W.D., Gillet C.E., Lakhani S.R., Corbishley C., Young M., Kirby R.S., Dearnaley D.P., Dowe A., Ardern-Jones A., Kelly J., Spurr N., Barnes D.M., Eeles R.A.: Immunohistochemical expression of BRCA2 protein and allelic loss at the BRCA2 locus in prostate cancer. CRC/BPG UK Familial Prostate Cancer Study Collaborators. *Int J Cancer* 1998; 78: 1-7.
34. Eeles R., Piver S., Lakhani S.R., Piek J.M., Ashworth A., Devilee P., Narod S., Meijers-Heijboer E.H., Venkitaraman A.R.: BRCA2 syndrome. 346-351 (w:) *WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, Tavassoli F.A., Devilee P. (red.), IARC Press, Lyon 2003.
35. Eeles R.A.: Screening for hereditary cancer and genetic testing, epitomised by breast cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1954-1962.
36. Eisen A., Lubiński J., Klijn J., Moller P., Lynch H.T., Offit K., Weber B., Rebbeck T., Neuhausen S.L., Ghadirian P., Foulkers W.D., Gershoni-Baruch R., Friedman E., Rennert G., Wagner T., Isaacs C., Kim-Sing C., Ainsworth P., Sun P., Narod S.A.: Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7491-7496.
37. Eisenkop S.M., Friedman R.L. i Wang H.: Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol* 1998; 69: 103-108.
38. El-Tamer M., Russo D., Troxel A., Bernardino L.P., Mazziotta R., Estabrook A., Ditkoff B.A., Schnabel F., Mansukhani M.: Survival and recurrence after breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 157-64.
39. Emerich J., Milczek T., Dębniak J., Majdak E.: Evaluation of surgical complications connected with intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer. *Ginekol Pol* 2002; 73: 1103-1108.
40. Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I., Pereira D., Lopes C.S.: Loss of β -catenin is associated with poor survival in ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 337-46.
41. Fathalla M.F.: Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163.
42. Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
43. Feeley K.M., Wells M.: Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 2001; 38 :87-95.

44. Ford D., Easton D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D., Devilee P., Bishop D.T., Weber B., Lenoir G., Chang-Claude J., Sobol H., Teare M.D., Struwing J., Arason A., Scherneck S., Peto J., Rebbeck T.R., Tonin P., Neuhausen S., Barkardottir R., Eyfjord J., Lynch H., Ponder B.A.J., Gayther S.A., Birch J.M., Lindblom A., Stoppa-Lyonnet D., Bignon Y., Borg A., Hamann U., Haites N., Scott R.J., Maugard C.M., Vasen H., Seitz S., Cannon-Albright L.A., Schofield A., Zelada-Hedman M., The Breast Cancer Linkage Consortium.: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676-689.
45. Försti A., Luo L., Vorechovsky I., Söderberg M., Lichtenstein P., Hemminki K.: Allelic imbalance on chromosome 13 i 17 and mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in monozygotic twins concordant for breast cancer. *Carcinogen* 2001; 22: 27-33.
46. Foster K.A., Harrington P., Kerr J., Russel P., DiCioccio R.A., Scott I.V., Jacobs I., Chenevix-Trench G., Ponder B.A.J., Gaytcher S.A.: Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 3622-3625.
47. Garcia A., Bussaglia E., Machin P., Matias-Guiu X., Prat J.: Loss of heterozygosity on chromosome 17q in epithelial ovarian tumors: association with carcinomas with serous differentiation. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 152-157.
48. Gayther S.A., Mangion J., Russell P., Seal S., Barfoot R., Ponder B.A.J., Stratton M.R., Easton D.: Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the *BRCA2* gene. *Nat Genet* 1997; 15:103-105.
49. Geck P., Sonneschein C., Soto A.M.: The D13S171 marker, misannotated to BRCA2, links to AS3 gene to various cancers. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 461-463.
50. Geck P., Szelei J., Jimenez J., Lin T.M., Sonnenschein C., Soto A.M.: Expression of novel genes linked to the androgen-induced, proliferative shutoff in prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 63: 211-8.
51. Geisler J.P., Geisler H.E., Tammela J., Wiemann M.C., Zhou Z., Miller G.A., Crabtree W.: Heat shock protein 27: an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 69: 14-16.
52. Geisler J.P., Hatterman-Zogg M.A., Rathe J.A., Buller R. E.: Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer. *J Nat Cancer Inst* 2002; 94: 61-67.

53. Gerber J.: Obraz kliniczny raka jajnika. 759-764 (w:) Markowska J. (red.), Onkologia Ginekologiczna, Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2002.
54. Goldgar D., Eeles R., Easton D., Lakhani S.R., Piver S., Piek J.M., van Diest P.J., Verheijen R.H.M., Szabo C., Monteiro A.N., Devilee P., Narod S., Meijers-Heijboer E.H., Sodha N.: BRCA1 syndrome. 338-345 (w:) WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, Tavassoli F.A., Devilee P. (red.), IARC Press, Lyon 2003.
55. Goldgar D.E., Easton D.F., Deffenbaugh A.M., Monteiro A.N., Tavtigian S.V., Couch F.J.; Breast Cancer Information Core (BIC) Steering Committee.: Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 535-44.
56. Gomez-Garcia E.B., Ambergen T., Blok M.J., van den Wijngaard A.: Patients with an unclassified genetic variant in the BRCA1 or BRCA2 genes show different clinical features from those with a mutation. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2185-90.
57. Górski B., Byrski T., Huzarski T., Jakubowska A., Menkiszak J., Gronwald J., Pluzanska A., Bebenek M., Fischer-Maliszewska L., Grzybowska E., Narod S.A., Lubinski J.: Founder mutations in BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1963-1968.
58. Górski B., Dębniak T., Jakubowska A., Cybulski C., Huzarski T., Byrski T., Złowocka E., Lubiński J.: Usefulness of polymorphic markers in exclusion of BRCA1/BRCA2 mutations in families with aggregation of breast/ovarian cancers. *J Appl Genet* 2003; 44: 419-423.
59. Górski B., Jakubowska A., Huzarski T., Byrski T., Gronwald J., Grzybowska E., Mackiewicz A., Stawicka M., Bebenek M., Sorokin D., Fiszer-Maliszewska L., Haus O., Janiszewska H., Niepsuj S., Gozdz S., Zaremba L., Posmyk M., Pluzanska M., Kilar E., Czudowska D., Wasko B., Miturski R., Kowalczyk J.R., Urbański K., Szwiec M., Koc J., Dębniak B., Rozmiarok A., Dębniak T., Cybulski C., Kowalska E., Tołoczko-Grabarek A., Zajaczek S., Menkiszak J., Medrek K., Masojc B., Mierzejewski M., Narod S.A., Lubinski J.: A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer* 2004; 110: 683-6.
60. Górski B., Lubiński J.: Test BRCA1. 31-34 (w:) Nowotwory dziedziczne 2002. Profilaktyka, diagnostyka, leczenie., Lubiński J. (red.), Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2003.
61. Gras E., Cortes J., Diez A., Alonso C., Matias-Guiu X., Baiget M., Prat J.: Loss of heterozygosity on chromosome 13q12-q14, BRCA-2

- mutations and lack of BRCA-2 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer* 2001; 92: 787-795.
62. Gronwald J., Elsakov P., Górski B., Lubiński J.: High incidence of 4153del1A BRCA1 gene mutations in Lithuanian breast - and breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94: 111-113.
63. Grudinina N.A., Golubkov V.I., Tikhomirova O.S., Brezhneva T.V., Hanson K.P., Vasilyev V.B., Mandelshtam M.Y.: Prevalence of widespread BRCA1 gene mutations in patients with familial breast cancer from St. Petersburg. *Genetika* 2005; 41: 405-410.
64. Grzybowska E., Zientek H., Jasinska A., Rusin M., Kozłowski P., Sobczak K., Sikorska A., Kwiatkowska E., Górniak L., Kalinowska E., Utracka-Hutka B., Włoch J., Chmielik E., Krzyzosiak W.J.: High frequency of recurrent mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Polish families with breast and ovarian cancer. *Hum Mutat* 2000; 16: 482-490.
65. Hall J.M., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B., King M.C.: Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-9.
66. Harada H., Uchida N., Shimada Y., Kumimoto H., Shinoda M., Imamura M., Ishizaki K.: Polymorphism and allelic loss at the AS3 locus on 13q12-13 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2001; 18: 1003-1007.
67. Hilton J.L., Geisler J.P., Rathe J.A., Hatterman-Zogg M.A., de Young B., Buller R.E.: Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Nat Cancer Inst* 2002; 94: 1396-1406.
68. Hirsh-Yechezkel G., Chetrit A., Lubin F., Friedman E., Peretz T., Gershoni R., Rizel S., Struewing J.P., Modan B.: Population attributes affecting the prevalence of BRCA mutation carriers in epithelial ovarian cancer cases in Israel. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 494-8.
69. Høgdall E.V., Ryan A., Kjaer S.K., Blaaker J., Christensen L., Bock J.E., Glud E., Høgdall C.K.: Loss of heterozygosity on the X chromosome is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma: from the Danish "MALOVA" Ovarian Carcinoma Study. *Cancer* 2004; 100: 2387-2395.
70. Høgdall E.V.S., Høgdall C.K., Blaaker J., Christensen L., Bock J.E., Vuust J., Glud E., Kjaer S.K.: K-ras alterations in Danish ovarian tumour patients. From the Danish "Malova" ovarian cancer study. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 31-36.
71. Hogervorst F.B., Nederlof P.M., Gille J.J., McElgunn C.J., Grippeling M., Pruntel R., Regnerus R., van Welsem T., van Spaendonk R.,

- Menko F.H., Kluijdt I., Dommering C., Verhoef S., Schouten J.P., van't Veer L.J., Pals G.: Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res* 2003; 63:1449-53.
72. Holshneider C.H., Berek J.S.: Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 3-10.
73. Horowitz N.S., Duska L.R.: Advances in the surgical management of ovarian cancer. *J Reprod Med* 2005; 50: 454-466.
74. Hosking L., Trowsdale J., Nicolai H., Solomon E., Foulkes W., Stamp G., Signer E., Jeffreys A.: A somatic BRCA1 mutation in ovarian tumour. *Nature Genet* 1995; 9: 343-344.
75. Hough C.D., Sherman-Baust C.A., Pizer E.S., Montz F.J., Im D.D., Rosenshein N.B., Cho K.R., Riggins G.J., Morin P.J.: Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 6281-6287.
76. Huncharek M., Geschwind J.F., Kupelnick B.: Perineal application of cosmetic talc and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 11,933 subjects from sixteen observational studies. *Anticancer Res* 2003; 23: 1955-1960.
77. Jakubowska A., Górski B., Byrski T., Huzarski T., Gronwald J., Menkiszak J., Cybulski C., Dębniak T., Hadaczek P., Scott R.J., Lubiński J.: Detection of germline mutations in the BRCA1 gene by RNA-based sequencing. *Hum Mutat* 2001; 18:149-156.
78. Janiszewska H., Haus O., Lauda-Świeciak A., Pasińska M., Laskowski R., Szymański W., Górski B., Lubiński J.: Frequency of three BRCA1 gene founder mutations in breast/ovarian cancer families from the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Clin Genet* 2003; 64: 502-508.
79. Jasinska A., Krzyzosiak W.J.: Prevalence of BRCA1 founder mutations in western Poland. *Hum Mutat* 2001; 17: 75.
80. Johannsson O., Ostermeyer E.A., Hakansson S., Friedman L.S., Johannsson U., Sellbeg G., Brondum-Nielsen K., Sele V., Olsson H., King M.C., Borg A.: Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 441-450.
81. Johannsson O.T., Ranstam J., Borg A., Olsson H.: Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population based study from southern Sweden. *J Clin Oncol* 1998; 16: 397-404.
82. Jongsma A.P.M., Piek J.M.J., Zweemer R.P., Verheijen R.H.M., Klein-Gebbinck J.W.T., van Kamp G.J., Jacobs I.J., Shaw P., van Diest P.J.,

- Kenemans P.: Molecular evidence for putative tumours suppressor genes on chromosome 13q specific to BRCA1 related ovarian and fallopian tube cancer. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2002; 55: 305-309.
83. Kimmig R., Wimberger P., Hillemans P., Kapsner T., Capsari C., Hepp H.: Multivariate analysis of prognostic significance of DNA-ploidy and S-phase fraction in ovarian cancer determined by flow cytometry following detection of cytokeratin-labeled tumor cells. *Gynecol Oncol* 2002; 84: 21-31.
84. Kjaer S.K., Mellekjaer L., Brinton L.A., Johansen C., Gridley G., Olsen J.H.: Tubal sterilization and risk of ovarian, endometrial and cervical cancer. A Danish population-based follow-up study of more than 65 000 sterilized women. *Int J Epidemiol* 2004; 33: 596-602.
85. Koul A., Malander S., Loman N., Pejovic T., Heim S., Willen R., Johannsson O., Olsson H., Ridderheim M., Borg Å.: BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer: covariation with specific cytogenetic features. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 289-295.
86. Kristensen G.B., Kildal W., Abeler V.M., Kaern J., Vergote I., Trope C.G., Danielsen H.E.: Large-scale genomic instability predicts long-term outcome for women with invasive stage I ovarian cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 1494-1500.
87. 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.
88. Kuprjańczyk J., Siedlecki J.A.: Molekularna patogeneza nowotworów złośliwych narządu rodnego. 48-66 (w:) Markowska J. (red.), *Onkologia Ginekologiczna*, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2002.
89. Kuprjańczyk J.: TP53 status determines prognostic and predictive factors in ovarian carcinomas. 93-111 (w:) *Trends in ovarian cancer research*, Bardos A.P. (red.), Nova Science Publishers 2004.
90. Kurman R.J., Seidman J.D., Shih I-M.: Serous borderline tumours of the ovary. *Histopathol* 2005; 47: 310-318.
91. Kurzawski G.: Analizy molekularne DNA i RNA w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. 11-26 (w:) *Nowotwory dziedziczne 2002. Profilaktyka, diagnostyka, leczenie.*, Lubiński J. (red.), Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2003.

92. Kushi L.H., Mink P.J., Folsom A.R., Anderson K.E., Zheng W., Lazovich D., Sellers T.A.: Prospective study of diet and ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 21-31.
93. Kwiatkowska E., Brożek I., Iżycka-Świeszewska E., Limon J., Mackiewicz A.: Novel *BRCA2* mutation in a Polish family with hamartoma and two male breast cancers. *J Med Genet* 2002; 39: E35.
94. Kwiatkowska E., Teresiak M., Breborowicz D., Mackiewicz A.: Somatic mutations in the *BRCA2* gene and high frequency of allelic loss of *BRCA2* in sporadic male breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 98: 943-945
95. La Vecchia C.: Epidemiology of ovarian cancer: a summary review. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10: 125-129.
96. Lakhani S.R., Manek S., Penault-Llorca F., Flanagan A., Arnout L., Merrett S., McGuffog L., Steele D., Devilee P., Klijn J.G., Meijers-Heijboer H., Radice P., Pilotti S., Nevanlinna H., Butzow R., Sobol H., Jacquemier J., Lyonet D.S., Neuhausen S.L., Weber B., Wagner T., Winqvist R., Bignon Y.J., Monti F., Schmitt F., Lenoir G., Seitz S., Hamman U., Pharoah P., Lane G., Ponder B., Bishop D.T., Easton D.F.: Pathology of ovarian cancers in *BRCA1* and *BRCA2* carriers. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2473-81.
97. Le Page C., Provencher D., Maugard C.M., Ouellet V., Mes-Mason A.: Signature of a silent killer: expression profiling in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 157-167.
98. Lee K.R., Tavassoli F.A., Prat J., Dietel M., Gersell D.J., Karseladze A.I., Hauptmann S., Rutgers J., Russell P., Buckley C.H., Pisani P., Schwartz P., Goldgar D.E., Silva E., Caduff R., Kubik-Huch R.A.: Surface epithelial-stromal tumours. 117-145 (w:) WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, Tavassoli F.A., Devilee P. (red.), IARC Press, Lyon 2003.
99. Levy-Lahad E., Lahad A., Eisenberg S., Dagan E., Paperna T., Kasinetz L., Catane R., Kaufman B., Beller U., Renbaum P., Gershoni-Baruch R.: A single nucleotide polymorphism in the *RAD51* gene modifies cancer risk in *BRCA2* but not *BRCA1* carriers. *PNAS* 2001; 98: 3232-3236.
100. Liede A., Malik I.A., Aziz Z., Rios Pd Pde L., Kwan E., Narod S.A.: Contribution of *BRCA1* and *BRCA2* mutations to breast and ovarian cancer in Pakistan. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 595-606.
101. Liu Y., Gansen T.S.: Tumour suppressor genes in sporadic epithelial ovarian cancer. *Reproduction* 2002; 123: 341-353.

- 102.Lubiński J., Phelan C.M., Ghadirian P., Lynch H.T., Garber J., Weber B., Tung N., Horsman D., Isaacs C., Monteiro A.N.A., Sun P., Narod S.A.: Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene. *Fam Cancer* 2004; 3: 1-10.
- 103.Lukanova A., Kaaks R.: Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypothesis. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 2005; 14: 98-107.
- 104.Lynch H.T., Snyder C. L., Lynch J.F., Riley B.D., Rubinstein W.S.: Hereditary breast-ovarian cancer at the bedside: role of the medical oncologist. *J Clin Oncol* 2003; 21: 740-753.
- 105.Majdak E.J., De Bock G.H., Brożek I., Perkowska M., Ochman K., Dębniak J., Milczek T.,Cornelisse C.J., 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: 143-50.
- 106.Makhija S., Sit A., Edwards R., Aufman K., Weiss H., Kanbour-Shakir A., Gooding W., D'Angelo G., Ferrell R., Raja S. i Godfrey T.E.: Identification of genetic alterations related to chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 3-9.
- 107.Malander S., Ridderheim M., Masback A., Loman N., Kristoffersson U., Olsson H.,Nilbert M., Borg A.: One in 10 ovarian cancer patients carry germ line BRCA1 or BRCA2 mutations: results of a prospective study in Southern Sweden. *Eur J Cancer* 2004; 40: 422-428.
- 108.Manderson E.N., Presneau N., Provencher D., Mes-Masson A., Tonin P.N.: Comparative analysis of loss of heterozygosity of specific chromosome 3, 13, 17, and X Loci and TP53 mutations in human epithelial ovarian cancer. *Mol Carcinog* 2002; 34: 78-90.
- 109.Manyś G.: Czynniki prognostyczne w raku jajnika. 789-798 (w:) Markowska J. (red.), *Onkologia Ginekologiczna*, Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2002.
- 110.Maquire P., Holmberg K., Kost-Alimova M., Imrech S., Skoog L., Lindbloom A.: CGH analysis of familial non-BRCA1/BRCA2 breast tumors and mutation screening of a candidate locus on chromosome 17q11.2-12. *Int J Mol Med* 2005; 16: 135-141.
- 111.Markowska J.: Markery nowotworowe w diagnozowaniu i monitorowaniu raka jajnika. 771-781 (w:) Markowska J. (red.), *Onkologia Ginekologiczna*, Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2002.

112. Marshfield human genetic maps, The Center for Medical Genetics.: http://research.marshfieldclinic.org/genetics/Map_Markers
113. Martinez S.L., Herzog J., Weitzel J.N.: Loss of five amino acids in BRCA2 is associated with ovarian cancer. *J Med. Genet* 2004; 41: E18
114. Menczer J., Modan M., Ranon L., Golan A.: Possible role of mumps virus in the etiology of ovarian cancer. *Cancer* 1979; 43: 1375-1379.
115. Menkiszak J., Gronwald J., Górski B., Jakubowska A., Huzarski T., Byrski T., Foszczyńska-Kłoda M., Haus O., Janiszewska H., Perkowska M., Brożek I., Grzybowska E., Zientek H., Góźdz S., Kozak-Klonowska B., Urbański K., Miturski R., Kowalczyk J., Plużańska A., Niepsuj S., Koc J., Szwiec M., Drosik K., Mackiewicz A., Lamperska K., Stróżyk E., Godlewski D., Stawicka M., Waśko B., Bębenek M., Rozmiarek A., Rzepka-Górska I., Narod S.A., Lubiński J.: Hereditary ovarian cancer in Poland. *Int J Cancer* 2003; 106: 942-5.
116. Menon U.: Ovarian cancer screening. *CMAJ* 2004; 171: 323-324.
117. Merajver S.D., Frank T.S., Xu J., Pham T.M., Calzone K.A., Bennett-Baker P., Chamberlain J., Boyd J., Garber J.E., Collins F.S., Weber B.L.: Germline BRCA1 mutations and loss of the wild-type allele in tumors from families with early onset breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 539-544.
118. Moslehi R., Chu W., Karlan B., Fishman D., Risch H., Fields A., Smotkin D., Ben-David Y., Rosenblatt J., Russo D., Schwartz P., Tung N., Warner E., Rosen B., Friedman J., Brunet J.S., Narod S.A.: *BRCA1* and *BRCA2* mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1259-1272.
119. Münstedt K., Folker E.F.: Role of primary surgery in advanced ovarian cancer. *World J Surg Oncol* 2004; 2: 32.
120. 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; 90: 1204-10.
121. Narod S.A., Boyd J.: Current understanding of the epidemiology and clinical implications of *BRCA1* and *BRCA2* mutations for ovarian cancer. *Cur Opin Obstet Gynecol* 2002, 14: 19-26.
122. Narod S.A., Sun P., Ghadirin P., Lynch H., Issacs C., Garber J., Weber B., Karlan B., Fishman D., Rosen B., Tung N., Neuhausen S.L., Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group.: Tubal ligation and risk of ovarian cancer in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations: a case-control study. *Lancet* 2001; 357: 1467-1470.

- 123.Ness R.B.: Endometriosis and ovarian cancer: Thoughts on shared pathophysiology. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 280-294.
- 124.Ness R.B., Grisso J.A., Cottreau C., Klapper J., Vergona R., Wheeler J.E., Morgan M., Schlesselman J.J.: Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. *Epidemiology* 2000; 11: 111-7.
- 125.Nielsen J.S., Jakobsen E., Hølund B., Bertelsen K., Jakobsen A.: Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 1086-1096.
- 126.Nowak-Markowitz E., Michalak M., Spaczyński M.: Wartość predykcyjna stężenia Ca 125 w optymalnej wtórnej cytoredukcji u chorych na zaawansowanego raka jajnika. *Współczesna Onkologia* 2003; 9: 662-667.
- 127.Okada S., Tsuda H., Takarabe T., Yoshikawa H., Taketani Y., Hirohashi S.: Allelotype analysis of common epithelial ovarian cancers with special reference to comparison between clear cell adenocarcinoma with other histological types. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 798-806.
- 128.Olson S.H., Mignone L., Nakraseive C., Caputo T.A., Barakat R.R., Harlap S.: Symptoms of ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 2: 212-217.
- 129.Ortiz B.H., Ailawadi M., Colitti C., Muto M.G., Deavers M., Silva E.G., Berkowitz R.S., Mok S.C., Gershenson D.M.: Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors. *Cancer Res* 2001; 16: 7264-7267.
- 130.Osorio A., de la Hoya M., Rodriguez-Lopez R., Martinez-Ramirez A., Cazorla A., Granizo J.J., Esteller M., Rivas C., Caldes T., Benitez J.: Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 99: 305-309.
- 131.Ottini L., Masala G., D'Amico C., Mancini B., Saieva C., Aceto G., Gestri D., Vezzosi V., Falchetti M., De Marco M., Paglierani M., Cama A., Bianchi S., Mariani-Costantini R., Palli D.: BRCA1 and BRCA2 mutation status and tumor characteristics in male breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 342-347.
- 132.Pal T., Permuth-Way J., Betts J.A., Krischer J.P., Fiorica J., Arango H., LaPolla J., Hoffman M., Martino M.A., Wakeley K., Wilbanks G., Nicosia S., Cantor A., Sutphen R.: BRCA1 and BRCA2 mutations

- account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* 2005; 104: 2807-2816.
133. Paramasivam S., Tripcony L., Crandon A., Quinn M., Hammond I., Mardsen D., Proietto A., Davy M., Carter J., Nicklin J., Perrin L., Obermair A.: Prognostic importance of preoperative CA-125 in International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage I Epithelial Ovarian Cancer: an Australian multicenter study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5938-5942.
134. Pejovic T., Himmelmann A., Heim S., Mandahl N., Floderus U.M., Furgyik S., Elmfors B., Helm G., Willen H., Mitelman F.: Prognostic impact of chromosome aberrations in ovarian cancer. *Br J Cancer* 1992; 65: 282-6.
135. Perkowska M., Brożek 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: 553-4.
136. Perren A., Weng L.P., Boag A.H., Ziebold U., Thakore K., Dahia P.L., Komminoth P., Lees J.A., Mulligan L.M., Mutter G.L., Eng C.: Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1999; 155: 1253-60.
137. Pharoah P.D.P., Easton D.F., Stockton D.L., Gayther S., Ponder B.A.: Survival in familial, BRCA1-associated, and BRCA2-associated epithelial ovarian cancer. United Kingdom Coordinating Committee for Cancer Research (UKCCCR). Familial Ovarian Cancer Study Group. *Cancer Res* 1999; 59: 868-871.
138. Pharoah P.D.P., Ponder B.A.J.: The genetics of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16: 449-468.
139. Phelan C.M., Rebbeck T.R., Weber B.L., Devilee P., Rutledge M.H., Lynch H.T., Lenoir G.M., Stratton M.R., Easton D.F., Ponder B.A., Cannon-Albright L., Larsson C., Goldgar D.F., Narod S.A.: Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nat Genet* 1996; 12: 309-11.
140. Piek J.M.J., Verheijen R.H.M., Kenemans P., Massuger L.F., Bulten H., van Diest P.J.: BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 491-500.
141. Pieretti M., Powell D.E., Gallion H.H., Case E.A., Conway P.S., Turker M.S.: Genetic alterations on chromosome 17 distinguish different types of epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol* 1995; 26: 393-397.

142. Pike M.C., Pearce C.L. i Wu A.H.: Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene* 2004; 23: 6379-6391.
143. Piver M.S.: Hereditary ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 85: 9-17.
144. Piver M.S.: Nowotwory nabłonkowe jajnika. 12-53 (w:) Podręcznik Onkologii Ginekologicznej, Piver M.S. (red.), Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999.
145. Pohlreich P., Zikan M., Stribrna J., Kleibl Z., Janatova M., Kotlas J., Zidovska J., Novotny J., Petruzelka L., Szabo C., Matous B.: High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 728-736.
146. Prat J., Ribé A., Gallardo A.: Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol* 2005; 36: 861-870.
147. Puls L.E., Duniho T., Hunter J.E., Kryscio R., Blackhurst D., Gallion H.: The prognostic implication of ascites advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 109-112.
148. Querzoli P., Albonico G., di Lasio M.G., Ferretti S., Rinaldi R., Cariello A., Pedriali M., Matteuzzi M., Maestri I., Nenci I.: Biophenotypes and survival of BRCA1 and TP53 deleted breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 66: 135-142.
149. Rebbeck T.R., Friebel T., Wagner T., Lynch H.T., Garber J.E., Daly M.B., Isaacs C., Olopade O.I., Neuhausen S.L., van 't Veer L., Eeles R., Evans D.G., Tomlinson G., Matloff E., Narod S.A., Eisen A., Domchek S., Armstrong K., Weber B.L.; PROSE Study Group.: Effect of short-term hormone replacement therapy on breast cancer risk reduction after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE study group. *Clin Oncol* 2005; 23: 7804-7810.
150. Riman T., Dickman P.W., Nilsson S., Nordlinder H., Magnusson C.M., Persson I.R.: Some life-style factors and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish women. *Eur J Epidemiol* 2004; 19: 1011-1019.
151. Risch H.A.: Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90: 1774-1786.
152. Risch H.A., McLaughlin J.R., Cole D.E.C., Rosen B., Bradley L., Kwan E., Jack E., Vesprini D.J., Kuperstein G., Abrahamson J.L.A., Fan I., Wong B., Narod S.A.: Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 700-710.

153. Rose S.L., Goodheart M.J., DeYoung B.R., Smith B.J., Buller R.E.: *p21* expression predicts outcome in p53-null ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1028-1032.
154. Rosenblatt K.A., Thomas D.B., The WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives.: Lactation and the risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 192-197.
155. Rossi A.C., Di Vagno G., Cormio G., Cazzolla A., Stefanelli S., Elia E.D., Selvaggi L.: A retrospective study of preoperative CA 125 levels in 82 patients with ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2004; 269: 263-265.
156. Rossing M.A., Tang M.T., Flagg E.W., Weiss L.K., Wicklund K.G.: A case-control study of ovarian cancer in relation to infertility and the use of ovulation-inducing drugs. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 1070-1078.
157. Rubin S.C.: BRCA-related ovarian carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 2127-2129.
158. Rubin S.C., Benjamin I., Behbakht K., Takahashi H., Morgan M.A., LiVolsi V.A., Berchuck A., Muto M.G., Garber J.E., Weber B.L., Lynch H.T., Boyd J.: Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *N Eng J Med* 1996; 335: 1413-1416.
159. Rufford B. Menon U., Jacobs I.: Screening for familial ovarian cancer. 220-233 (w:) Morrison P.J., Hodgson S.V., Haites N.E., (red.), *Familial breast and ovarian cancer. Genetics, screening and management.*, 2002, Cambridge University Press.
160. Runnebaum I.B., Stickeler E.: Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 73-79.
161. Runnebaum I.B., Wang-Gohrke S., Vesprini D., Kreienberg R., Lynch H., Moslehi R., Ghadirian P., Weber B., Godwin A.K., Risch H., Garber J., Lerman C., Olopade O.I., Foulkers W.D., Karlan B., Warner E., Rosen B., Rebbeck T., Tonin P., Dubé M., Kieback D.G., Narod S.A.: Progesterone receptor variant increases ovarian cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers who were never exposed to oral contraceptives. *Pharmacogenet* 2001; 11: 635-638.
162. Salazar R., Cruz-Hernandez J.J., Sanchez-Valdivieso E., Rodriguez C.A., Gomez-Bernal A., Barco E., Fonseca E., Portugal T., Gonzalez-Sarmiento R.: BRCA1-2 mutations in breast cancer: identification of nine new variants of BRCA1-2 genes in a population from Central Western Spain. *Cancer Letters* 2006; 233: 172-177.

- 163.Sato N., Tsunoda H., Nishida M., Morishita Y., Takimoto Y., Kubo T., Noguchi M.: Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene *PTEN* in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of ovary. *Cancer Res* 2000; 60: 7052-7056.
- 164.Schildkraut J.M., Schwingl P.J., Bastos E., Evanoff A., Hughes C.: Epithelial ovarian risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 554-559.
- 165.Schuijjer M., Berns E.M.: TP53 and ovarian cancer. *Hum Mutat* 2003;21:285-91.
- 166.Schultz D.C., Vanderveer L., Berman D.B., Hamilton T.C., Wong A.J., Godwin A.K.: Identification of two candidate tumor suppressor genes on chromosome 17p13.3. *Cancer Res* 1996; 56: 1997-2002.
- 167.Shattuck T.M., Kim T.S., Costa J., Yandell D.W., Imanishi Y., Palanisamy N., Gaz R.D., Shoback R.D., Clark O.H., Monchik J.M., Wierman M.E., Hollenberg A., Tojo K., Chaganti R.S.K, Arnold A.: Mutational analyses of RB and BRCA2 as candidate tumour suppressor genes in parathyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 180-189.
- 168.Silverberg S.G.: Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 7-15.
- 169.Skaśko E., Paszko Z., Niwińska A., Kwiatkowska E., Kruczek A., Pieńkowski T.: The presence of hereditary BRCA1 gene mutations in women with familial breast or ovarian cancer and the frequency of occurrence of these tumours in their relatives. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 470-474.
- 170.Skirnisdóttir I., Sorbe B., Karlsson M., Seidal T.: Prognostic importance of DNA ploidy and p53 in early stages of epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001; 19: 1295-1302.
- 171.Smith D.I.: Transcriptional profiling develops molecular signatures for ovarian tumors. *Cytometry* 2002; 47: 60-2.
- 172.Stanisiz A.: Przystępny kurs statystyki w oparciu o program Statistica PL na przykładach z medycyny, t.2, Statsoft, Kraków 2000.
- 173.Stanisiz A.: Przystępny kurs statystyki w oparciu o program Statistica PL na przykładach z medycyny, Statsoft, Kraków 1998.
- 174.Stempczyńska J., Potemski P.: Nowotwory jajnika. 190-195 (w:) *Onkologia-podręcznik dla studentów i lekarzy*, Kordek R., Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A. (red.), Medical Press, Gdańsk 2003.

175. Strauss G.: Trzon macicy. 181-251 (w:) Ginekologia praktyczna, Pschyrembel W., Strauss G., Petri E. (red.), Warszawa 1994.
176. Strong L.C.: Hereditary cancer: lessons from Li-Fraumeni syndrome. *Gynecol Oncol* 2003; 88: S4-S7.
177. Swisher E.: Ovarian cancer associated with inherited mutations in BRCA1 or BRCA2. *Curr Womens Health Rep* 2003; 3: 27-32.
178. Szewierski Z.: Chemioterapia raka jajnika. 826-839 (w:) Markowska J. (red.), *Onkologia Ginekologiczna*, Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2002.
179. Tavassoli M., Steingrimsdottir H., Pierce E., Jiang X., Alagoz M., Farzaneh F., Campbell I.G.: 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; 74:115-9.
180. The Breast Cancer Information Core Database (BIC), The National Human Genome Research Institute (NHGRI): <http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic>.
181. The GDB Human Genome Database: <http://www.gdb.org/>
182. Thompson D., Easton D. and Breast Cancer Linkage Consortium: Variation in cancer risk, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 410-419.
183. Tikhomirova L., Sinicka O., Smite D., Eglitis J., Hodgson S.V., Stengrevics A.: High prevalence of two BRCA1 mutations, 4154de1A and 5382insC, in Latvia. *Fam Cancer* 2005; 4: 77-84.
184. Tumors of ovary and peritoneum: p. 116 (w:) WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, Tavassoli F.A., Deville P. (red.), IARC Press, Lyon 2003.
185. Tuxen M.K.: Tumor marker CA125 in ovarian cancer. *J Tumor Marker Oncol* 2001; 16: 49-68.
186. Van der Looij M., Szabo C., Besznyak I., Liszka G., Csokay B., Pulay T., Toth J., Devilee P, King MC, Olah E.: Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer* 2000; 86: 737-40.
187. Venkitaraman A.R.: A growing network of cancer-susceptibility genes. *N Engl J Med* 2003; 348: 1917-1919.

- 188.Vergote I., De Brabanter J., Fyles A., Bertelsen K., Einhorn N., Sevelde P., Gore M.E., Kærn J., Verrelst H., Sjøvall K., Timmerman D., Vandewalle J., Van Gramberen M., Tropé C.G.: Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 2001; 357: 176-182.
- 189.Vergote I.B., Abeler V.M., Borner O.P., Stigbrand T., Trope C., Nustad K.: CA125 and placental alkaline phosphatase as serum tumor markers in epithelial ovarian carcinoma. *Tumour Biol* 1992; 13: 168-174.
- 190.Wagner T., Stoppa-Lyonnet D., Fleischmann E., Muhr D., Pagès S., Sandberg T., Caux V., Moeslinger R., Langbauer G., Borg A., Oefner P.: Denaturing High-Performance Liquid Chromatography detects reliably *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *Genomics* 1999; 62: 369-376.
- 191.Wang C., Horiuchi A., Imai T., Ohira S., Itoh K., Nikaido T., Katsuyama Y., Konishi I.: Expression of *BRCA1* protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the *BRCA1* gene. *J Pathol* 2004; 202: 215-223.
- 192.Werness B.A., Ramus S.J., Whittenore A.S., Garlinghouse-Jones K., Oakley-Girvan I., Dicioccio R.A., Tsukada Y., Ponder B.A.J., Piver M.S.: Histopathology of familial ovarian tumors in women from families with and without germline *BRCA1* mutations. *Hum Pathol* 2003; 31: 1420-1424.
- 193.Whittemore A.S., Balise R.P., Pharoah P.D.P., Dicioccio R.A., Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer (kConFab), Oakley-Girvan I., Ramus S.J., Daly M., Usinowicz M.B., Garlinghouse-Jones K., Ponder B.A.J., Buys S., Senie R., Andrulis I., John E., Hoppler J.L., Piver M.S.: Oral contraceptive use and ovarian cancer risk among carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Br J Cancer* 2004; 91: 1911-1915.
- 194.Whittemore A.S., Harris R., Itnyre J., The Collaborative Ovarian Cancer Group.: Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1184-1203.
- 195.Wojciechowska U., Didkowska J., Tarkowski W., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2002 roku, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 2004 Warszawa.
- 196.Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyen K., Seal S., Tran T., Averill D.: Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088-90.

197. Wysocka B.: Analiza ewolucji kariotypowej w procesie progresji raka jajnika. Rozprawa doktorska. Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk 1997.
198. Xiao W., Oefner P.J.: Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: a review. *Hum Mutat* 2001; 17: 439-474.
199. Yu Y., Xu F., Peng H., Fang X., Zhao S., Li Y., Cuevas B., Kuo W., Gray J.W., Siciliano M., Mills G.B. i Bast R.C.: NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 214-219.

Serdecznie dziękuję

Panu Profesorowi Januszowi Limonowi za pomoc i opiekę promotorską w trakcie prowadzenia badań i pisanie rozprawy doktorskiej.

Prof. Januszowi Emerichowi i dr Jarosławowi Dębniakowi oraz prof. Marii Hrabowskiej za udostępnienie materiału do badań i danych klinicznych pacjentek

Dr Izabeli Brożek za pomoc w zebraniu danych i opracowaniu wyników badań

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki za stworzenie życzliwej atmosfery w pracy

Mężowi i Całej Rodzinie za wyrozumiałość i wsparcie we wszelkich dążeniach

Dziękuję.