

Magdalena Ratajska

Częstość występowania i kosegregacja wybranych mutacji
genów *BRCA1* i *2* w rodzinach z agregacją raka piersi.

(rozprawa doktorska)

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

Gdańsk 2010

Praca została sfinansowana przez Ministerstwa Nauki i Informatyzacji, grant N401164 31/3656 oraz Swedish Cancer Society, King Gustav V's Jubilee Foundation, Mrs. Berta Kamprads Foundation, Gunnar Arvid & Elisabeth Nilsson Foundation oraz Fundację Szpitala Uniwersyteckiego w Lund.

SPIS TREŚCI

1.WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki	6
1.2. Substancje chemiczne i roztwory	7
1.3. Symbole aminokwasów	8
1.4. Geny i białka	9
1.5. Pozostałe skróty	10
2. STRESZCZENIE	11
2.1. Abstract	13
3. WSTĘP	15
3.1. Podłoże molekularne choroby nowotworowej	15
3.1.1. Rozwój choroby nowotworowej	16
3.1.1.1. Inicjacja	16
3.1.1.2. Promocja	17
3.1.1.3. Progresja	17
3.1.2. Geny zaangażowane w proces nowotworzenia	17
3.1.2.1. Protoonkogeny i onkogeny	17
3.1.2.2. Geny supresyjne oraz geny ochraniające integralność genomu	19
3.2. Nowotwory piersi i jajnika	20
3.2.1. Dziedziczne postacie nowotworów	24
3.2.1.1. Geny <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> oraz ich produkty białkowe	27
3.2.1.1.1. Funkcje białek <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	29
3.2.1.1.2. Mutacje w genach <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	34
3.2.1.2. Inne geny zaangażowane w występowanie rodzinnej agregacji zachorowań na raka piersi i/lub jajnika	38
3.2.1.2.1. Geny o wysokiej penetracji: <i>TP53</i> , <i>PTEN</i>	38
3.2.1.2.2. Geny o umiarkowanej i niskiej penetracji: <i>BRIP1</i> , <i>BARD1</i> i <i>CHEK2</i>	39

3.3. Techniki molekularne stosowane w badaniach mutacji genów	41
3.4. Podsumowanie	44
4. CELE	45
5. MATERIAŁ I METODY	46
5.1. Materiał	46
5.1.1. Kryteria rodowodowe	46
5.1.2. Charakterystyka kliniczna badanych kobiet	47
5.1.3. Aparatura	48
5.1.4. Odczynniki	49
5.1.5. Roztwory	51
5.2. Metody	53
5.2.1. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej	54
5.2.2. Izolacja DNA z tkanek nowotworowych zatopionych w parafinie	55
5.2.3. Izolacja RNA z limfocytów krwi obwodowej	56
5.2.3.1. Synteza cDNA	56
5.2.4. Test przedwczesnej terminacji translacji	57
5.2.4.1. Startery zastosowane w analizie PTT	57
5.2.4.2. Amplifikacja fragmentów DNA techniką PCR	58
5.2.4.3. Translacja <i>in vitro</i> i rozdział elektroforetyczny produktów białkowych.	60
5.2.4.3.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego i warunki rozdziału elektroforetycznego.	60
5.2.4.4. Analiza PTT	61
5.2.5. Wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa	64
5.2.5.1. Amplifikacja fragmentów DNA.	70
5.2.6. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	72
5.2.6.1. Analiza wyników MLPA	72
5.2.7. Sekwencjonowanie wybranych produktów PCR	72

5.2.8. Wariant sekwencyjny: IVS14+1G>A	74
5.2.9. Częstość występowania wariantu sekwencyjnego c.10095delCins11 w grupie kontrolnej.	75
5.2.10. Nazewnictwo mutacji genów <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> .	76
5.2.11. Metody statystyczne.	77
6. WYNIKI	78
6.1. Wyniki analizy sekwencji genów <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	78
6.2. Wyniki analizy dużych delecji i insercji w genach <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> .	88
6.3. Znaczenie wariantu sekwencyjnego c.10095delCins11 w występowaniu rodzinnej agregacji zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.	89
6.4. Analiza kosegregacyjna w rodzinach z mutacją w genach <i>BRCA1/2</i> .	91
6.5. Związek wybranych parametrów klinicznych z obecnością i rodzajem mutacji w genach <i>BRCA1/2</i> .	96
6.5.1. Analiza częstości i rodzaju wykrytych mutacji w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi oraz piersi i/lub jajnika.	96
6.5.2. Analiza obecności i rodzaju mutacji w stosunku do rodzaju nowotworu i wieku zachorowania.	97
6.5.3. Statystyczna analiza zależności wieku zachorowania na raka piersi i/lub jajnika od obecności mutacji w genach <i>BRCA1/2</i>	100
7. Dyskusja	102
8. WNIOSKI	115
9. PIŚMIENNICTWO	116
10. ZAŁĄCZNIKI	140

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki

g	gram
kDa	kilodalton, jednostka masy
l	litr, dm^3
m	mol, około $6,0221415(10) \cdot 10^{23}$ cząsteczek
M	stężenie molowe, mol/dm^3
', min.	minuta
", sek.	sekunda
U	jednostka enzymu
T	tera, 10^{12}
G	giga, 10^9
M	mega, 10^6
k	kilo, 10^3
d	decy, 10^{-1}
c	centy, 10^{-2}
m	mili, 10^{-3}
μ	mikro, 10^{-6}
n	nano, 10^{-9}
p	piko, 10^{-12}
f	femto, 10^{-15}

1.2. Substancje chemiczne i roztwory

A	adenina
APS	nadsiarczan amonu (<i>ammonium persulphate</i>)
C	cytozyna
ddH₂O	podwójnie destylowana woda
dNTPs	dezoksyrybonukleotydy (adeninowy, guaninowy, tyminowy i cytozynowy)
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
G	guanina
KHCO₃	wodorowęglan potasu
MgCl₂	chlorek magnezu
NaCl	chlorek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
NH₄Cl	chlorek amonu
(NH₄)₂SO₄	siarczan amonu
RBC	bufor do lizy erytrocytów (<i>red blood cell lysis buffer</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
T	tymina
TAE	bufor do elektroforezy z kwasem octowym (<i>Tris – Acetate – EDTA</i>)
TBE	bufor do elektroforezy z kwasem bornym (<i>Tris – Borate – EDTA</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TRIS	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol

1.3. Symbole aminokwasów

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

1.4. Geny i białka

APC	gen podatności na rodzinną polipowatość jelita grubego (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
ATM	gen kodujący kinazę białkową serynowo-treoninową, zmutowaną w zespole ataksji-teleangiektazji (<i>ataxia telangiectasia mutated</i>)
ATR	gen kodujący kinazę białkową z rodziny PI3/PI4, zmutowaną w zespole ataksji-teleangiektazji (<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>)
BACH1 (BRIP1)	gen kodujący helikazę RNA zależną od ATP (<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>)
BARD1	gen kodujący białko oddziałujące z domeną RING BRCA1 (<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>)
BCL2	gen chłoniaka B-komórkowego (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
BRCA1	gen podatności na raka piersi 1 (<i>breast cancer susceptibility gene 1; breast cancer 1, early onset</i>)
BRCA2	gen podatności na raka piersi 2 (<i>breast cancer susceptibility gene 2; breast cancer 2, early onset</i>)
BCR/ABL	gen fuzyjny (<i>breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia</i>) powstały w wyniku translokacji chromosomów t(9;22)
CHK2	gen kodujący kinazę białkową serynowo-treoninową, zaangażowaną w proces naprawy DNA (<i>CHK2 checkpoint homolog</i>)
c-MYC	protoonkogen komórkowy (<i>myelocytomatosis</i>)
EGFR	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (<i>epithelial growth factor</i>)
FGF	czynnik wzrostu fibroblastów (<i>fibroblast growth factor</i>)
GDP	guanozynodwufosforan (<i>guanosine diphosphate</i>)
GTP	guanozynotrójfosforan (<i>guanosine triphosphate</i>)
HER2-NEU	gen kodujący ludzki receptor nabłonkowego czynnika wzrostu typ II (<i>human epidermal receptor 2</i>)
MLH1	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>)
MLH2	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>mutL homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>)
MRE11	gen kodujący białko o aktywności egzonukleazy i endonukleazy (<i>MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i>)
MSH6	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>mutS (E. coli) homolog 6</i>)
NBS1	gen kodujący białko nibrynę (p95) (<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>)
NF1	gen nerwiakowłóknikowości typu 1 (<i>neurofibromatosis type 1</i>)
PMS1	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>PMS1</i>)

	<i>postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)</i>
PMS2	gen podatności na niepolipowatego raka jelita grubego (<i>PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)</i>)
PALB2	gen kodujący białko oddziałujące z BRCA2 (<i>partner and localizer of BRCA2</i>)
PTEN	gen kodujący homolog fosfatazy i tensyny (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)
RAD50	gen kodujący homolog białka bakteryjnego RecA (<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae)</i>)
RB1	gen siatkówczaka złośliwego (<i>retinoblastoma</i>)
TP53	gen kodujący białko TP53 (<i>tumour protein 53</i>)

1.5. Pozostałe skróty

ASA PCR	amplifikacja specyficzna w stosunku do allelu (<i>allele-specific amplification polymerase chain reaction</i>)
BIC	Baza: (Breast Cancer Information Core, http://research.nhgri.nih.gov/bic/)
DHPLC	denaturacyjna wysokosprawnościowa chromatografia cieczowa (<i>denaturing high performance liquid chromatography</i>)
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in-situ</i> (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
HA	analiza heterodupleksów (<i>heteroduplex analysis</i>)
NMD	Proces polegający na rozpoznawaniu i niszczeniu transkryptów zawierających przedwczesny kodon STOP (<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
PTT	technika przedwczesnej terminacji translacji (<i>protein truncating test</i>)
pz	par zasad
SSCP	analiza konformacji pojedynczych nici DNA (<i>single strand conformation polymorphism</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organization</i>)

2. STRESZCZENIE

BRCA1 i *BRCA2* są dwoma głównymi genami, których mutacje warunkują podatność na wystąpienie raka piersi i jajnika. Do tej pory w sekwencji tych genów opisano ponad 3000 różnych zmian, spośród których wiele jest patogennych, niemniej opisywane są także niesklasyfikowane warianty sekwencyjne i polimorfizmy. Standardowo w poszukiwaniu mutacji w tych genach wykorzystuje się metody oparte o technikę PCR, takie jak np.: wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (DHPLC), analiza konformacji jednoniciowych fragmentów DNA lub sekwencjonowanie bezpośrednie. Wadą tego podejścia do analizy mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* jest możliwość przeoczenia obecności dużych delecji i/lub insercji, a w konsekwencji część rodzin z występującą agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika nie zostanie właściwie zdiagnozowana.

Celem rozprawy było określenie częstości i spektrum mutacji punktowych oraz dużych delecji/insercji *BRCA1* i 2 w rodzinach z agregacją raka piersi i/lub jajnika. Analizę mutacji punktowych przeprowadzono z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej, testu przedwczesnej terminacji translacji oraz bezpośredniego sekwencjonowania. Duże delecje i/lub insercje wykrywano techniką MLPA (wielokrotna amplifikacja zależna od ligacji fragmentów).

Badanie przeprowadzono w grupie 155 kobiet z silną rodzinną agregacją zachorowań na te nowotwory, będących pod opieką onkologicznej poradni genetycznej w Wojewódzkim Centrum Onkologii w Gdańsku w latach 1999–2007. Pacjenci, którzy zostali zakwalifikowani do badania spełniali jedno z trzech kryteriów rodowodowych dotyczących krewnych I^o oraz II^o: i) co najmniej trzy zachorowania na raka piersi w rodzinie, ii) co najmniej dwa zachorowania na raka piersi i/lub raka jajnika w rodzinie, w tym przynajmniej jedno przed 50 rż lub co najmniej jedno zachorowanie na raka piersi u mężczyzny iii) jedna osoba w rodzinie, u której rozpoznano zarówno raka piersi, jak i jajnika.

Spośród wszystkich pacjentek zakwalifikowanych do badania, 95 pochodziło z rodzin, w których występowała agregacja zachorowań na raka piersi, 55

z rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika oraz pięć z rodzin, w których występowały zachorowania wyłącznie na raka jajnika.

W badanej grupie 155 rodzin wykryto 64 (41,2%) mutacje w jednym z genów, przy czym w 57 rodzinach występowało nosicielstwo mutacji w genie *BRCA1* (89%) a w siedmiu w genie *BRCA2* (11%). Duże rearanżacje wykryto u dwóch (5%) spośród 43 pacjentek z wykluczoną mutacją punktową. W sumie zidentyfikowano 22 różne mutacje, w tym: 13 (59%) powodujących zmianę ramki odczytu, sześć (27%) mutacji nonsens oraz dwie pojedyncze mutacje powodujące zmianę aminokwasową oraz błędne składanie mRNA.

Najczęściej wykrywanymi mutacjami były: 5382insC (40,6%, n=26/64) oraz 300T>G (18,8%, 12/64), które są uznawane w Polsce za mutacje założeńskie. Ponadto znaleziono inne powtarzające się mutacje oraz zmiany dotychczas nieopisane lub też opisywane sporadycznie. Te pozostałe mutacje stanowiły ponad 40% wszystkich mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają istnienie w Polsce silnego, aczkolwiek ograniczonego efektu założyciela. Wykazano mianowicie, iż dużą część mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*, stanowią mutacje inne niż założeńskie. Po raz pierwszy opisano u polskich osób z grupy ryzyka występowanie dużych delecji genu *BRCA1*. Dlatego też należy sądzić, że u pacjentek z silnie obciążonym wywiadem, u których wykluczono nosicielstwo jednej z najczęstszych mutacji, badaniem molekularnym powinny zostać objęte całe geny z zastosowaniem także technik wykrywających duże mutacje.

2.1. Abstract

BRCA1 and BRCA2 are two major breast cancer susceptibility genes. To date, more than 3000 different sequence variants have been described. Many of them are disease-associated, but also unclassified variants and polymorphisms are included. Traditionally, mutation screening entails the use of PCR-based methods such as denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), single strand conformation polymorphism analysis or direct sequencing. One of the shortcomings of this traditional approach is that large rearrangements may be overlooked and as a consequence a proportion of the families that initially test negative for mutations in BRCA1/2 will not be properly diagnosed.

The aim of this study was to evaluate the prevalence and spectrum of BRCA1/2 point mutations and large deletions/duplications in breast cancer families from Northern Poland. Pre-screening using the DHPLC and PTT technique, followed by sequencing, was carried out for BRCA1 and BRCA2 germline point mutations. Screening for large duplications and insertions in BRCA1 and BRCA2 genes was performed using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

The study comprises 155 families with clustering of breast and/or ovarian cancer who were referred to the Regional Oncological Outpatient Clinic in Gdańsk, in the period 1999–2007 and who met one of the following criteria: i) three first or second degree relatives (from one parental side of the family) with breast or ovarian cancer diagnosed at any age; ii) two affected family members with breast or ovarian cancer with at least one of the cancers diagnosed before the age of 50, or one male breast cancer; iii) one family member affected with both breast and ovarian cancer. Of the 155 breast and/or ovarian cancer families thus accrued, there were 95 site-specific breast cancer families, 55 breast/ovarian cancer families and five site-specific ovarian cancer families.

Germline mutations were detected in 64 (41,2%) of the 155 families, including 57 families with mutation in BRCA1 (89%) and seven families with mutation in BRCA2 (11%). Two families (5%) out of 43 without detected point mutation in *BRCA1/2*, showed the presence of large deletion in BRCA1. Among all patients, 22 different mutations were identified, including 13 (59%) frame-shifting deletions

or insertions, six (27%) nonsense, one missense and one splice site mutation. Among detected mutations the most frequent are: 5382insC (40,6%; n=26/64) and 300T>G (18,8%; 12/64) which are well-known European founder mutations. In the present study a high proportion of recurrent mutations was detected (classification based on BIC and published data), together with novel mutations or the ones that have been described occasionally, they accounted for more than 40% of positive BRCA1 and BRCA2 families. Our results are largely in agreement with other investigations performed in families from the Polish population. However, our results demonstrate an unusually high frequency of alterations other than founder mutations. This observation may be explained by differences in family inclusion criteria, screening method strategy and sensitivity, or just by random variation within these groups.

We confirm the presence of strong but limited founder effect in Poland. Our results indicate that the spectrum of BRCA1/2 mutations is more broad than previously suggested. Moreover, this study is the first to describe the presence of large deletions in BRCA1 gene. To conclude, our results indicate the necessity for extended analysis among patients negative for BRCA1/2 founder mutation.

3. WSTĘP

3.1. Podłoże molekularne choroby nowotworowej

Powstawanie nowotworu jest procesem wieloletnim i składa się z następujących po sobie trzech faz: inicjacji, promocji i progresji, gdzie każdej z nich towarzyszy szereg zmian na poziomie genomowym, komórkowym, tkankowym i narządowym, które w konsekwencji prowadzą do powstania pełnoobjawowego nowotworu złośliwego (Foulds, 1957; Hanahan, 2000). Zmiany te polegają głównie na zaburzeniach regulacji proliferacji, apoptozy, różnicowania się, naprawy powstałych uszkodzeń DNA oraz nabywaniu przez komórki nowotworowe zdolności do naciekania sąsiednich tkanek, jak również do tworzenia przerzutów w innych narządach.

W czasie rozwoju choroby nowotworowej dochodzi do nagromadzenia się mutacji w DNA komórkowym. Mutacje te mogą mieć charakter delecji jedno lub wielonukleotydowej, amplifikacji lub też przemieszczenia genów w obrębie genomu. W ich efekcie powstają także wtórne zaburzenia ekspresji genów, których konsekwencją jest dalsza dezintegracja genomu komórki. W dalszym etapie rozwoju choroby bardzo często występuje zjawisko mikroewolucji komórkowej, które polega na wyodrębnieniu się subklonów komórkowych. Na skutek dalszej, trwającej niekiedy wiele lat selekcji formuje się ostatecznie dominujący klon, który tworzy klinicznie dostrzegalny guz nowotworowy.

Nowotwory można podzielić ze względu na ich charakter na nowotwory łagodne (dobrze odgraniczone od sąsiednich tkanek) oraz na nowotwory złośliwe charakteryzujące się zdolnością do naciekania sąsiednich tkanek i tworzenia przerzutów. Nowotwory złośliwe, ze względu na ich pochodzenie, można podzielić na: guzy pochodzenia ektodermalnego (raki), guzy wywodzące się z tkanki łącznej (mięsaki), melanocytów (czerniaki) oraz nowotwory wywodzące się z komórek krwiotwórczych (białaczki, chłoniaki i in.) (Limon, 2006).

3.1.1. Rozwój choroby nowotworowej

Przekształcenie się komórki prawidłowej w komórkę nowotworową jest określane terminem transformacji nowotworowej. Proces ten cechuje nie tylko wieloetapowy i złożony charakter zachodzących zmian, ale także długi okres utajenia. Wyniki badań wskazują, że średni czas rozwoju guza o średnicy 1cm wynosi pięć lat. (Nowell, 1976; Biernat, 2004; Pasz-Walczak, 2004)

3.1.1.1. Inicjacja

Etap inicjacji rozpoczyna się z chwilą wystąpienia pierwszej mutacji. Kolejne mutacje mogą pojawić się zarówno spontanicznie, jak też być konsekwencją zmian już istniejących.

Mutacje genów nie są równocenne, co oznacza, że uszkodzenia niektórych genów mogą mieć znacznie poważniejsze konsekwencje dla komórki. Dotyczy to na przykład mutacji w genie *TP53*, które są obecne w ponad połowie wszystkich komórek nowotworowych (Siedlecki, 2006). Natomiast w przypadku mutacji genów o niskiej penetracji (ang. *low-penetrance genes*) do zapoczątkowania procesu kancerogenezy wymagane są nie tylko zmiany w innych, współdziałających genach, ale również wpływ różnych czynników środowiskowych. Zależność ta dotyczy głównie genów zaangażowanych w ścieżki metaboliczne, proces apoptozy i naprawę uszkodzeń DNA (Kotnis, 2005).

3.1.1.2. Promocja

Promocja jest drugim etapem transformacji nowotworowej, który rozpoczyna się w momencie przekształcenia komórki prawidłowej w komórkę nowotworową. Na tym etapie dochodzi do nagromadzenia się mutacji genowych i chromosomowych oraz zwiększenia aktywności mitotycznej komórki, a w końcu do powstania ograniczonego rozrostu komórek nowotworowych (*carcinoma in situ*) (Siedlecki, 2006).

3.1.1.3. Progresja

Progresja to trzeci i ostatni etap procesu nowotworzenia. Dochodzi do kolejnych mutacji oraz unaczynienia guza (neoangiogeneza). Na skutek mikroewolucji komórkowej wyodrębniony zostaje dominujący klon komórkowy, który decyduje o biologii powstającego guza nowotworowego. Komórki nowotworowe mogą swobodnie migrować, co skutkuje naciekaniem sąsiednich tkanek oraz tworzeniem przerzutów w odległych narządach (Witkowski, 2002; Siedlecki, 2006).

3.1.2. Geny zaangażowane w proces nowotworzenia

3.1.2.1. Protoonkogeny i onkogeny

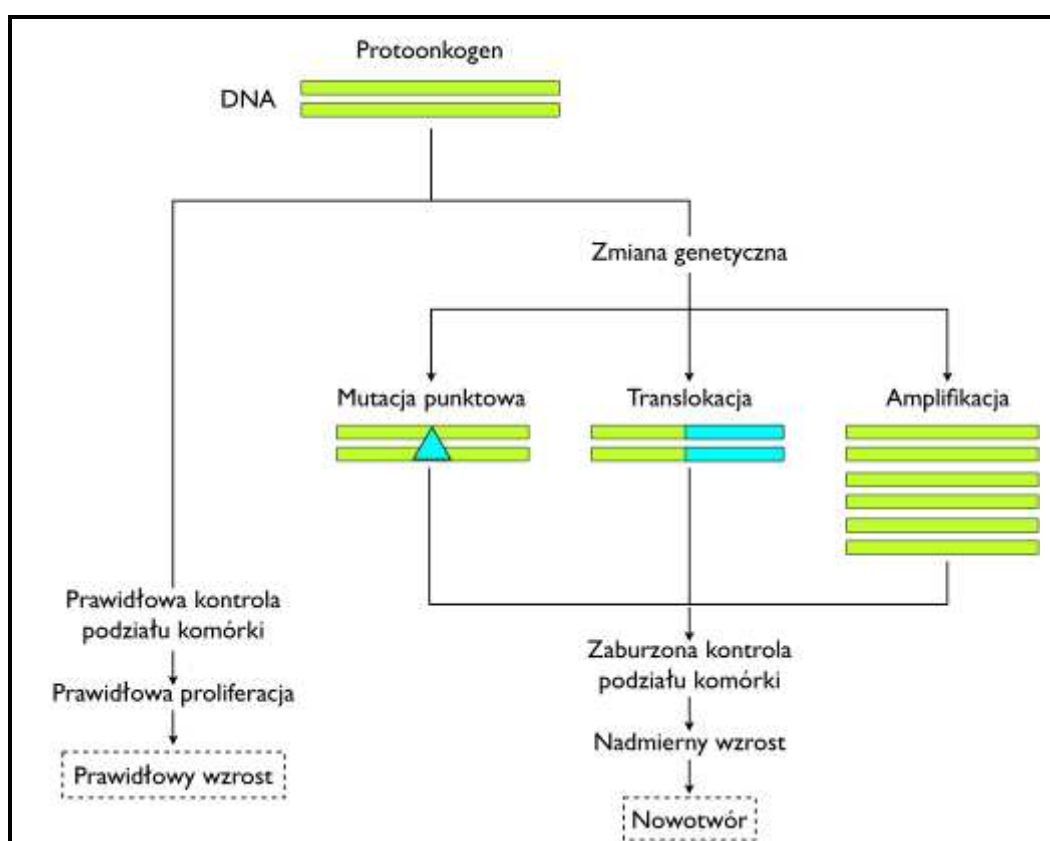
Po raz pierwszy opisano występowanie onkogenów w genomach wirusów. Zauważono, że mogą one zaburzać dojrzewanie i proliferację zainfekowanych wirusami komórek jak również prowadzić do powstawania nowotworów u szczurów, myszy i kurcząt.

Ponad 20 onkogennych wirusów ma w prawidłowych komórkach ssaczych geny homologiczne określane terminem protoonkogenów (Passarge, 2004).

Do chwili obecnej opisano około 500 różnych protoonkogenów. Zależnie od pełnionej funkcji można podzielić je na trzy grupy. Pierwszą grupę stanowią geny, których produkty są odpowiedzialne za kontrolę prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego. Wyróżniamy tu między innymi: czynniki wzrostu, receptory dla czynników wzrostu, niereceptorowe kinazy białkowe i czynniki transkrypcyjne. Grupę drugą stanowią protoonkogeny kodujące białka uczestniczące w procesie apoptozy, na przykład białka wchodzące w skład błony mitochondrialnej i

jądrowej BCL-2 i BAC. Grupa trzecia skupia geny kodujące białka tworzące kanały jonowe (Siedlecki, 2006).

Aktywacja protoonkogenu w onkogen może nastąpić na drodze mutacji punktowej, translokacji chromosomowej lub amplifikacji (Ryc. 1) (Passarge, 2004; Hunter, 1997)



Ryc. 1. Mechanizmy aktywacji protoonkogenu (schemat wg Passarge, 2004)

Przykładem mutacji punktowej prowadzącej do aktywacji onkogenu są zmiany w obrębie kodonów 12 i 63 genu *HRAS* (Passarge, 2004). Prawidłowy gen *HRAS* jest protoonkogenem kodującym białko o aktywności GTPazy, które jest zaangażowane w wielu kaskadach sygnałowych. Mutacja tego genu (p.12G>V) jest częstą zmianą w komórkach raka pęcherza (Buyru, 2003). Bezpośrednim efektem tej mutacji jest konstytutywna aktywacja białka *HRAS* i ciągle, niezależne od warunków zewnętrznych, przekazywanie sygnałów stymulujących wzrost i podziały komórkowe (Tong, 1989; Krengel, 1990).

Przykładem aktywacji protoonkogenu na drodze aberracji chromosomowej jest translokacja wzajemna pomiędzy chromosomami 9 i 22, t(9;22), w wyniku której

dochodzi do przeniesienia, zlokalizowanego w chromosomie 9q34, protoonkogenu *ABL* na chromosom 22q11, gdzie dochodzi do jego połączenia z sekwencją BCR (ang. *breakpoint cluster region*). Wykazano, że produkt fuzyjnego genu *BCR/ABL* nie tylko nadmiernie stymuluje podziały komórkowe, ale także, powoduje obniżoną adhezję komórek do podścieliska szpiku, co może mieć związek z łatwiejszym przenikaniem tych komórek ze szpiku kostnego do krwi obwodowej (Verfaillie, 1997).

Amplifikacja *HER-NEU* w raku piersi jest przykładem trzeciego z mechanizmów prowadzących do aktywacji protoonkogenu. Badanie stwierdzające obecność amplifikacji *HER-NEU* w komórce rakowej jest obecnie stosowanym rutynowo badaniem diagnostycznym FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in-situ*, ang. *fluorescence in situ hybridization*) raka piersi, które wnosi istotne informacje na temat przewidywanego przebiegu leczenia i podatności na określone leki przeciwnowotworowe (Limon, 2006).

3.1.2.2. Geny supresorowe oraz geny ochraniające integralność genomu

Podział genów na geny supresorowe (ang. *tumour suppressor genes* - TSG) oraz geny ochraniające integralność genomu (tzw. geny stabilizujące) jest bardzo płynny. Dlatego też wiele z genów, które dotychczas były uważane za TSG, obecnie zostało zaklasyfikowane do genów stabilizujących lub też, przez niektórych autorów, ze względu na pełnione funkcje, geny te są przypisywane do obu grup jednocześnie (Limon, 2006; Siedlecki, 2006; Weinberg i wsp., 2007; Campeau, 2008).

Podstawową funkcją genów supresorowych jest negatywna kontrola cyklu komórkowego. Produkty białkowe tych genów rozpoznają miejsce pojawiających się uszkodzeń DNA i powodują zatrzymanie podziałów komórkowych na czas ich naprawy lub, jeśli uszkodzenia są zbyt duże a ich naprawa jest niemożliwa, kierują komórkę na drogę apoptozy.

Natomiast produkty genów ochraniających integralność genomu są zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA powstałych w czasie trwania replikacji lub na skutek działania czynników mutagennych. Do tej grupy należą geny kodujące elementy systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (ang.

mismatch repair - MMR), usuwające uszkodzoną zasadę (ang. *base-excision repair* - BER) lub też cały fragment uszkodzonego DNA (ang. *nucleotide-excision repair* - NER).

Geny, których produkty są zaangażowane w rekombinację oraz segregację chromosomów (np.: *BRCA1*, *BLM*, *ATM*) są przypisywane do jednej z dwóch opisanych wcześniej grup genów i tak jak wspomniano na początku tego podrozdziału klasyfikacja ta jest zróżnicowana.

Mutacje w genach supresorowych i genach ochraniających integralność genomu komórki mogą dwiema drogami prowadzić do wzrostu ryzyka rozwoju nowotworu: (1) bezpośrednio lub (2) pośrednio.

Ad (1) Mutacje genów, których produkty są zaangażowane w negatywną regulację cyklu komórkowego lub promowanie apoptozy (są to tzw. geny „bramkowe“ ang. *Gatekeepers*), w sposób bezpośredni wpływają na podwyższenie ryzyka wystąpienia nowotworu - najbardziej znanym przedstawicielem tej rodziny genów jest gen *TP53*.

Ad (2) Natomiast mutacje w genach o wpływie „pośrednim” (tzw. geny „opiekuńcze” ang. *Caretakers*), do których zaliczamy *BRCA1* i *BRCA2*, prowadzą m.in. do upośledzenia mechanizmów naprawczych, a tym samym do niestabilności genomowej i prawdopodobieństwa akumulacji uszkodzeń DNA w jądrze komórkowym (Buchholz, 1999; Biernat, 2004).

3.2. Nowotwory piersi i jajnika

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym wśród kobiet i stanowi około 20% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe. Każdego roku z powodu raka piersi umiera w Polsce około 5 tysięcy kobiet (Jeziorski, 2004). W 2003 roku w kraju odnotowano 11733 nowe zachorowania na ten nowotwór (Krzemieniecki, 2005). Wzrost zachorowań na raka piersi przypada między 45 a 54 rokiem życia i obniża się po okresie menopauzy (Jacobs i wsp., 1999). Ze wzrostem zachorowania na raka piersi są związane takie czynniki ryzyka jak: rodzinne występowanie tego nowotworu, wczesne pojawienie się pierwszej miesiączki,

późny początek menopauzy, bezdzietność lub pierwsza ciąża po trzydziestym roku życia (Glover, 1995; Arver, 2000; Lissowska, 2008; Jeziorski, 2004).

Zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) raki piersi możemy podzielić na nienaciekające (przedinwazyjne, raki *in situ*) oraz raki naciekające. W grupie raków nienaciekających wyróżniamy dwa podtypy: raki przewodowe nienaciekające (DCIS, *ductual carcinoma in situ*) oraz raki zrazikowe nienaciekające (LCIS, *lobular carcinoma in situ*). Raki naciekające dzielimy natomiast na raki przewodowe naciekające (*infiltrating ductual carcinoma*), w tej podgrupie wyróżniamy raki niesklasyfikowane (NOS, *not otherwise specified*) oraz postacie specjalne (rak śluzowy - *mucinous carcinoma*, rak rdzeniasty - *medullary carcinoma*, rak brodawkowaty - *papillary carcinoma*, rak cewkowy - *tubular carcinoma*), oraz na raki zrazikowe naciekające (*infiltrating lobular carcinoma*) (Jeziorski, 2004).

Ze względu na obecność lub brak receptorów estrogenowych (ER), raki piersi dzieli się na guzy receptorowo dodatnie (ER+) lub ujemne (ER-). Pierwsze z nich stanowią 60-70% pierwotnych raków piersi i są najczęściej spotykane u chorych po menopauzie. Guzy ER ujemne występują głównie u chorych przed menopauzą, przy czym u 1/3 chorych, u których w pierwotnym guzie nie stwierdzono obecności receptorów, w momencie wznowy są one obecne w komórkach guza (Glover, 1995).

Rzeczony raka piersi przebiega wieloetapowo a powstanie nowotworu złośliwego jest poprzedzone rozwojem atypowej hiperplazji oraz *carcinoma in situ*. Zmiany genetyczne zachodzące w czasie procesu nowotworzenia obejmują amplifikację onkogenów *MYC* i *HER-NEU*, oraz materiału genetycznego znajdującego się w długich ramionach chromosomu 11q13. Ponadto stwierdza się występowanie mutacji w genie *TP53*, a także utratę heterozygotyczności markerów mikrosatelitarnych (*loss of heterozygosity* - LOH) w chromosomach: 1, 3p, 6q, 7q, 8p, 11, 13q, 16q, 17, 18q i 22q (Bieche i Linderau, 1995).

Rak jajnika jest szóstym, co do częstości nowotworem złośliwym u kobiet i piątą przyczyną zgonów. Odsetek zachorowań jest wyższy w krajach wysokorozwiniętych. Na świecie w ostatnich latach obserwowany jest powolny

wzrost zachorowań na ten nowotwór. Rak jajnika jest diagnozowany w każdym wieku, jednak wzrost zachorowań przypada pomiędzy 40 a 70 rokiem życia, a 75% kobiet, u których zdiagnozowano ten nowotwór jest w III-IV stadium zaawansowania choroby. Okres pięcioletniego przeżycia dotyczy tylko 25% pacjentek z tą chorobą (Stempczyńska i Potemski, 2004). Czynniki ryzyka rozwoju raka jajnika są podobne jak dla raka piersi i obejmują między innymi: rodzinne występowanie tego nowotworu, wczesne pojawienie się pierwszej miesiączki i bezdzietność. Pozytywny wpływ na zmniejszenie ryzyka wystąpienia nowotworu jajnika ma przyjmowanie doustnych środków antykoncepcyjnych (Glover, 1995, Stempczyńska i Potemski, 2004).

Zgodnie z klasyfikacją histologiczną nowotwory jajnika dzieli się na trzy główne grupy (Stempczyńska i Potemski, 2004):

- I. Nowotwory pochodzenia nabłonkowego (komórki nabłonka pokrywającego jajnik). Wśród nich wyróżnia się postacie surowicze, śluzowe, endometroidalne oraz jasnokomórkowe. W zależności od stopnia złośliwości nowotwory nabłonkowe można podzielić na trzy grupy:
 - guzy łagodne
 - guzy o granicznej złośliwości
 - guzy złośliwe
- II. Nowotwory wywodzące się ze sznurów płciowych i zrębu jajnika (*sex cord stromal tumours*). Stanowią one niewielki procent wszystkich nowotworów jajnika (4-6%), a około 85% wykazuje czynność hormonalną (produkcja estrogenów).
- III. Nowotwory wywodzące się z komórek rozrodczych. Stanowią one około 20% wszystkich guzów jajnika. W grupie tej wyróżniamy rozrodczaki, nowotwory pęcherzyka żółciowego, raki zarodkowe oraz potworniaki.

Podobnie jak w przypadku raka piersi, choroba rozwija się etapami, a zmiany genetyczne zachodzące w czasie jej trwania obejmują aktywację protoonkogenów (*HER-NEU*, *FMS*, *KRAS*, *MYC*), inaktywację genów supresorowych (np. *TP53*), zaburzenia metylacji, jak również LOH w chromosomach: Xp, 5q, 6, 9p, 11, 13q, 17, 18q oraz 22q, co sugeruje, że w trakcie trwania procesu nowotworzenia dochodzi do utraty funkcji wielu genów

supresorowych (Shelling, 1995). Akumulacje tych wszystkich zmian genetycznych, działanie czynników wzrostu i cytokin prowadzi ostatecznie do rozwoju zaawansowanego raka jajnika (Berek, 1995; Dubeau 1998).

Rak piersi u mężczyzn stanowi około 0,7% wszystkich diagnozowanych raków piersi, obserwuje się jednak stały wzrost zachorowań na ten nowotwór, a w ciągu ostatnich 25 lat liczba zachorowań wzrosła o 26%. Średni wiek zachorowania przypada na około 67 rok życia i jest o pięć lat wyższy niż u kobiet z rakiem piersi, jednakże przypadki raka piersi diagnozowano u mężczyzn od 5 do 93 roku życia (Giordano, 2004; Giordano, 2005).

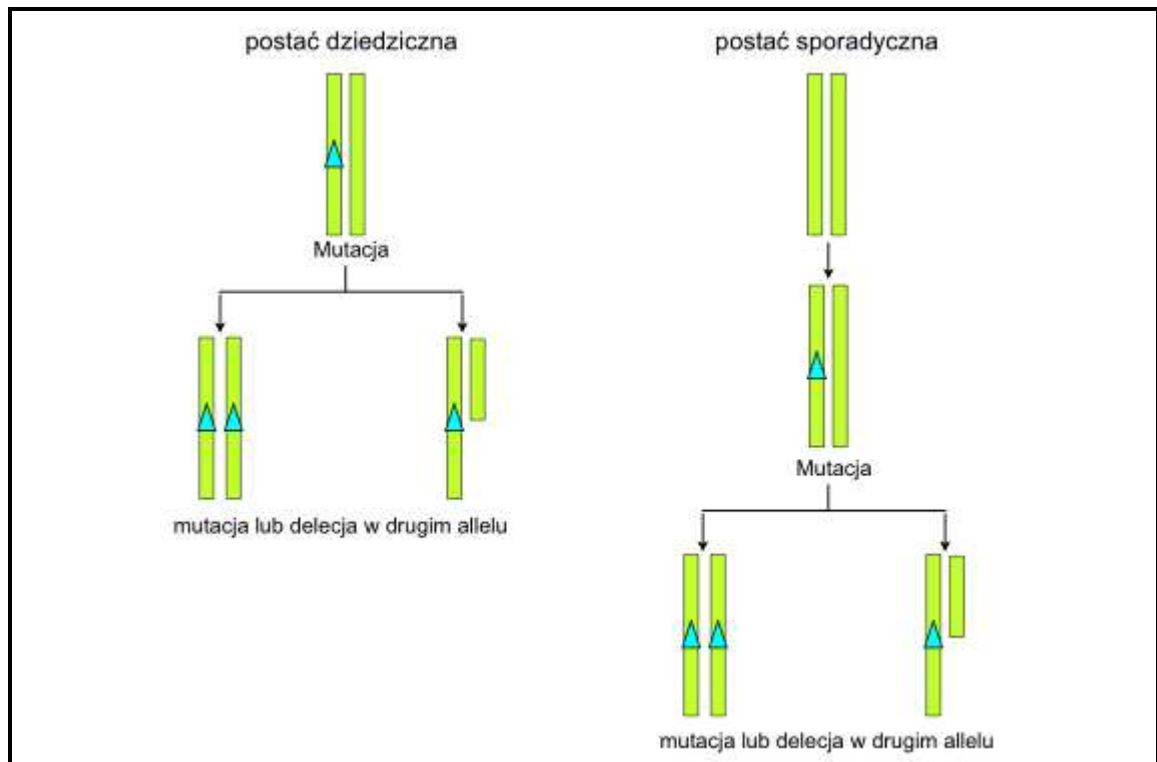
Etiologia raka piersi u mężczyzn nie jest jasna, wydaje się jednak, że znaczenie w powstawaniu tej choroby mogą odgrywać zaburzenia hormonalne, niezstąpienie jąder, wrodzona przepuklina pachwinowa, amputacja lub zapalenie jądra (Sasco, 1993; Thomas, 1992). U 3-7% mężczyzn z rakiem piersi stwierdza się zespół Klinefeltera, a zatem ryzyko wystąpienia nowotworu w tej grupie chorych jest 50 razy wyższe w stosunku do populacji ogólnej (Harnden, 1971; Hultborn, 1997; Casagrande, 1988). Mężczyźni, w rodzinach których występowała agregacja zachorowań na raka piersi mają ryzyko zachorowania na ten nowotwór 2,5 raza wyższe niż w populacji ogólnej (Rosenblatt, 1991). Najczęstszymi postaciami histologicznymi są wysoko zróżnicowane raki przewodowe (naciekające lub nienaciekające) oraz raki śluzowe i brodawkowate (Niezabitowski, 1998).

Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* również prowadzą do wzrostu ryzyka zachorowania na raka piersi u mężczyzn, jednak ryzyko to jest znacznie niższe niż w przypadku kobiet będących nosicielkami mutacji w tych genach (Couch, 1996; Thorlacius, 1996; Basham, 2002). W serii badań przeprowadzonych w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, od 10 do 16% mężczyzn z rakiem piersi, było nosicielami mutacji w genie *BRCA1* (Ford, 1998; Frank, 2002). Jednakże wśród mężczyzn chorych na raka piersi mutacje w genie *BRCA2* są znacznie częstsze (Couch, 1996; Friedman, 1997; Mavraki, 1997; Haraldsson, 1998; Struewing, 1999; Sverdlov, 2000; Kwiatkowska, 2001; Basham, 2002; Frank, 2002; Ottini, 2003).

Najwyższy odsetek mutacji w genie *BRCA2* występuje w populacji fińskiej, gdzie ponad 40% mężczyzn z rakiem piersi jest nosicielami mutacji założycielskiej: 999del5 (Thorlacius, 1996; Thorlacius, 1997). Rokowanie dla mężczyzn z rakiem piersi jest zbliżone do rokowania wśród kobiet z tym nowotworem, jednak ze względu na późniejszą diagnozę i wyższy stopień zaawansowania choroby czasy przeżycia są znacznie krótsze (Giordano, 2004; Scott-Conner, 1999).

3.2.1. Dziedziczne postacie nowotworów

Mechanizm leżący u podstaw najczęstszych nowotworów dziedzicznych wyjaśnia teoria "dwóch uderzeń" Alfreda Knudsona (Knudson, 1971). Po raz pierwszy została ona wykorzystana do zrozumienia różnic w mechanizmie powstawania postaci dziedzicznej i sporadycznej siatkówczaka złośliwego (retinoblastoma). Siatkówczak złośliwy jest najczęstszym nowotworem oka wieku niemowlęcego i wczesnodziecięcego (częstość występowania 1/15-18.000 noworodków), rozwija się na skutek homozygotycznych mutacji w genie *RB1* (kodującym fosfoproteinę uczestniczącą w kontroli cyklu komórkowego), które prowadzą do utraty funkcji tego genu. Siatkówczak złośliwy może występować w postaci jedno- lub obustronnej, jak również może mieć on charakter jedno- lub wieloogniskowy (Fredman, 1997; Passarge, 2004). U około 10-15% chorych stwierdza się rodzinną agregację zachorowań na ten nowotwór (Fredman, 1997; Prost, 2003). W postaci dziedzicznej (dziedziczenie autosomalne dominujące) jedno z rodziców chorego dziecka również ma zmutowany gen *RB1*, a we wszystkich komórkach organizmu osoby, która odziedziczyła taką nieprawidłowość występuje tylko jeden prawidłowy allel *RB1* (Fredman, 1997). A zatem w postaci germinalnej w odróżnieniu od postaci sporadycznej, występuje tylko jeden prawidłowy allel wspomnianego genu, a ryzyko wystąpienia mutacji prowadzącej do inaktywacji drugiego allela jest 1000 razy wyższe niż powstanie *de novo* dwóch mutacji somatycznych na dwóch allelach tego samego genu (Ryc.2) (Buchholz, 1999).



Ryc. 2. Model Knudsona na przykładzie siatkówczaka złośliwego (schemat wg Limon, 2006)

Tylko 5-10% wszystkich nowotworów powstaje w efekcie mutacji germinalnych i dotyczy to najczęściej nowotworów piersi, jajnika i jelita grubego. W tab. 1 zamieszczono niektóre zespoły, w których występuje rodzinna agregacja zachorowań na nowotwory. Cechami charakterystycznymi nowotworów dziedzicznych jest głównie agregacja zachorowań w rodzinie oraz młody wiek w momencie zachorowania. W przypadku nowotworów dziedzicznych, sam proces nowotworzenia także przebiega wieloetapowo, a na potencjalny rozwój choroby mogą wpływać takie czynniki jak: środowisko, w którym żyjemy, styl życia oraz geny modyfikujące (Beggs, 2009).

Tab. 1. Zespoły dziedziczne, w których występuje rodzinna agregacja zachorowań na nowotwory.

ZESPÓŁ	GEN	LOCUS	NOWOTWORY CHARAKTERYSTYCZNE
ataksja-telangiektazja (AT)	<i>ATM</i>	11q23	raki piersi, białaczki
choroba Cowdena	<i>PTEN</i>	10q23	raki piersi i tarczycy
polipowatość rodzinna (FAP, <i>familial adenomatous polyposis</i>)	<i>APC</i>	5q21	raki jelita grubego, okrężnicy, tarczycy, żołądka
rodzinny rak piersi typu 1 i 2	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	17q21 13q12	raki piersi, jajnika, prostaty, jelita grubego. W przypadku mutacji w genie <i>BRCA2</i> dodatkowo mogą występować zachorowania na raka trzustki i raka piersi u mężczyzn.
wrodzony niepolipowaty rak jelita grubego - zespoły Lynch I i II (HNPCC, <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>)	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS1</i> <i>PMS2</i>	3p21 2p16 2p16 2p32 7p22	raki jelita grubego, okrężnicy, żołądka, endometrium, jajnika
Zespół Li-Fraumeni (LFS, <i>Li-Fraumeni syndrome</i>)	<i>TP53</i>	17p13	raki piersi, mózgu, białaczki, mięsaki

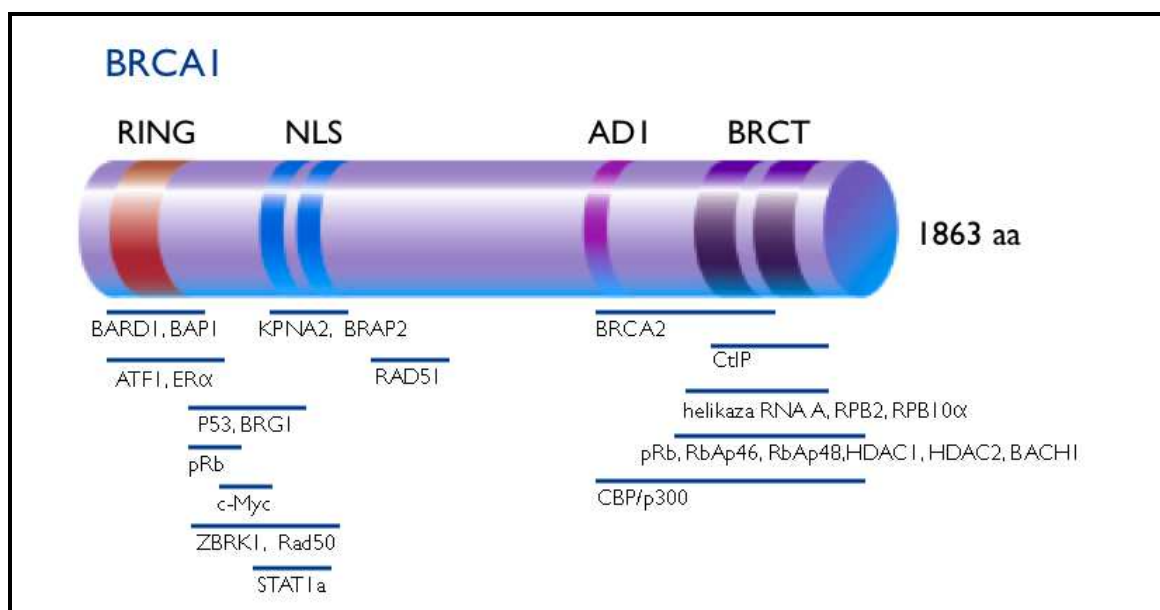
U 16-25% chorych, u których w rodzinach stwierdza się agregację zachorowań na raka piersi i raka jajnika, wykrywane są mutacje w genach o wysokiej penetracji, głównie *BRCA1* i *BRCA2* (Beggs, 2009; Pharoah, 2008). Podobnie jak w przypadku innych dziedzicznych postaci nowotworów, do najsilniejszych czynników ryzyka wystąpienia tej choroby zaliczamy obciążony wywiad rodzinny, młody wiek zachorowania (przed 40 r. ż.), występowanie obustronnych raków piersi (w tym jednego przed 50 r. ż.), jak również współwystępowanie w rodzinie innych nowotworów, w tym najczęściej raka jajnika (Arver, 2000; Easton, 2008). Nosicielki mutacji mają podwyższone ryzyko zachorowania na raka piersi (odp. 65% i 45% dla nosicielek mutacji w genie *BRCA1* i *BRCA2*) oraz na raka jajnika (odp. 39% i 11%) (Oldenburg, 2007).

3.2.1.1. Geny *BRCA1* i *BRCA2* oraz ich produkty białkowe

Występowanie rodzinne raków piersi i jajnika, dziedziczonego autosomalnie dominująco, po raz pierwszy opisano we wczesnych latach 70tych. W roku 1990 zlokalizowano region w długich ramionach chromosomu 17, w obrębie którego powinien znajdować się poszukiwany gen (Hall, 1990; Narod, 1991). Od tamtej chwili wiele zespołów badawczych prowadziło badania mające na celu precyzyjne określenie lokalizacji oraz identyfikację tego genu. W rezultacie wytypowano około 20 genów kandydatów, jednakże analiza molekularna nie wykazała obecności mutacji w tych genach (Bowcock, 1993; Cohen, 1993, Deville, 1993; Easton, 1993; Goldgar, 1993; Lindblom, 1993; Mazoyer, 1993; Smith, 1993; Spurr, 1993; Teare, 1993; Zimmermann, 1993; Goldgar, 1994; Friedman, 1994a; Smith, 1994; Steichen-Gersdorf, 1994). Ostatecznie w roku 1994 udało się określić region o wielkości 600kb, zlokalizowany pomiędzy markerami mikrosatelitami D17S1321 oraz D17S1325 i z zastosowaniem metody klonowania pozycyjnego, zlokalizować poszukiwany gen w chromosomie 17q21 (Neauhausen, 1994; Miki, 1994).

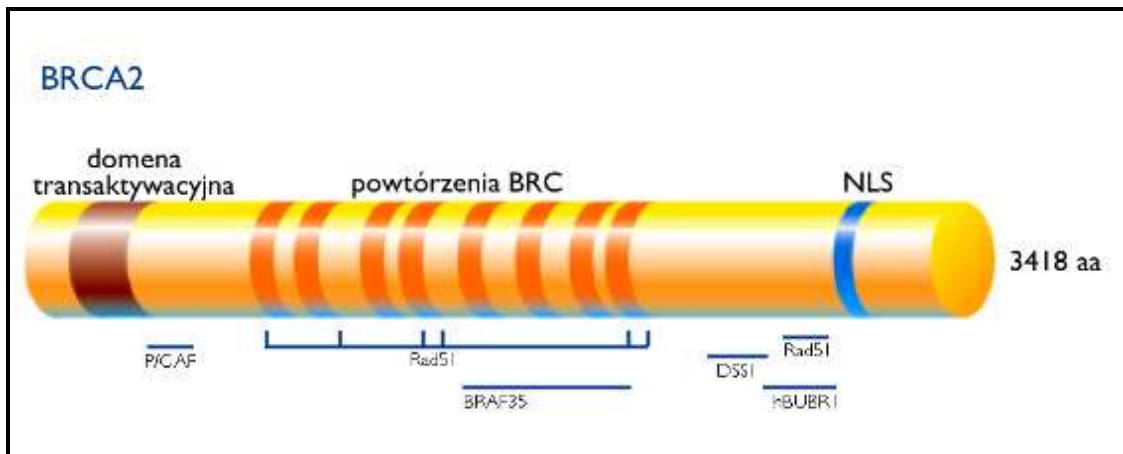
Gen *BRCA1* jest zbudowany z 24 eksonów, z których 22 kodują białko o długości 1836 aminokwasów i masie 220 kDa (Miki, 1994; Smith, 1996) (Ryc. 3). Ma dwa możliwe miejsca startu transkrypcji znajdujące się w eksonach 1A i 1B, które nie ulegają translacji, a także niekodujący ekson czwarty (Xu, 1995; Smith, 1996). Prawidłowy transkrypt *BRCA1* ma długość 8kb, jednakże zaobserwowano również istnienie form alternatywnych (7kb, 4,6kb i 1,5-2,2kb), których ekspresja jest tkankowo specyficzna, a także wariantów białka powstałych na skutek procesu alternatywnego składania, głównie jako efekt delecji w obrębie eksonu 11 (Thankur, 1997; Wang, 1997; Wilson, 1997; Cui, 1998). Gen *BRCA1*, w którym stwierdza się delecję nukleotydów od 672 do 4092 koduje białko *BRCA1Δ11* o masie 97kDa które jest najlepiej poznaną izoformą *BRCA1* (Huber, 2001). Gen *BRCA1*, poza domeną RING znajdującą się w N-terminalnej części (eksony 2-5), nie wykazuje homologii z innymi genami. Domena RING oddziałuje z DNA, a także jest odpowiedzialna za tworzenie kompleksów z innymi białkami biorącymi udział w transkrypcji (*BRCA1-associated RING domain protein 1* - *BARD1*, *BRCA1-associated protein 1* - *BAP1*, czynnik transkrypcyjny E2F, cykliny oraz kinazy zależne od cyklin). Inne ważne domeny w *BRCA1* to zlokalizowane

w centralnej części białka dwie sekwencje NLS (NLS1, aa 501-507; NLS2, aa 607-614), przy czym do prawidłowej lokalizacji do jądra niezbędna jest tylko sekwencja NLS1, oraz dwa powtórzenia BRCT (*BRCA1 carboxylterminal*) występujące w części C-terminalnej (Chen, 1996 a, b; Thakur, 1997). Wykazano, iż drugie z powtórzeń BRCT ma istotne znaczenie w regulacji transkrypcji zależnej od TP53, a także oddziałuje z CBP/p300 (Ouchi, 1998; Chai, 1999). Ponadto powtórzenia BRCT są niezbędne dla interakcji BRCA1 z holoenzymem polimerazy RNAII (Scully, 1997; Anderson, 1998; Neish, 1998).



Ryc. 3. Struktura białka BRCA1 (schemat wg Hedenfalk, 2002)

Gen *BRCA2* (chromosom 13q12-13) zidentyfikowano w roku 1995 (Wooster, 1995; Tavtigian, 1996) (Ryc. 4). Zbudowany jest z 27 eksonów, z których 26 koduje białko o długości 3418 aminokwasów i masie 384 kDa. Ekson pierwszy, podobnie jak w *BRCA1*, jest niekodujący, a początek ramki odczytu znajduje się w pozycji n.229 (Tavtigian, 1996; Chen, 1998). Podobnie jak *BRCA1*, gen *BRCA2* ma bardzo duży ekson 11, który obejmuje około połowę sekwencji transkryptu oraz jest bardzo bogaty w sekwencje AT. *BRCA2* nie wykazuje homologii do innych genów. W części N-terminalnej kodowanego przez *BRCA2* białka znajduje się domena aktywacji transkrypcji, w części centralnej jest zlokalizowanych osiem kopii powtórzeń BRC, a w części C-terminalnej, sekwencja lokalizacji w jądrze (NLS). Sekwencja eksonu trzeciego *BRCA2* wykazuje homologię do sekwencji czynnika transkrypcyjnego *JUN*.



Ryc. 4. Struktura białka BRCA2 (schemat wg Hedenfalk, 2002)

3.2.1.1.1. Funkcje białek BRCA1 i BRCA2

Do najważniejszych funkcji tych białek należy zaliczyć naprawę uszkodzeń DNA, regulację transkrypcji i cyklu komórkowego.

Naprawa DNA

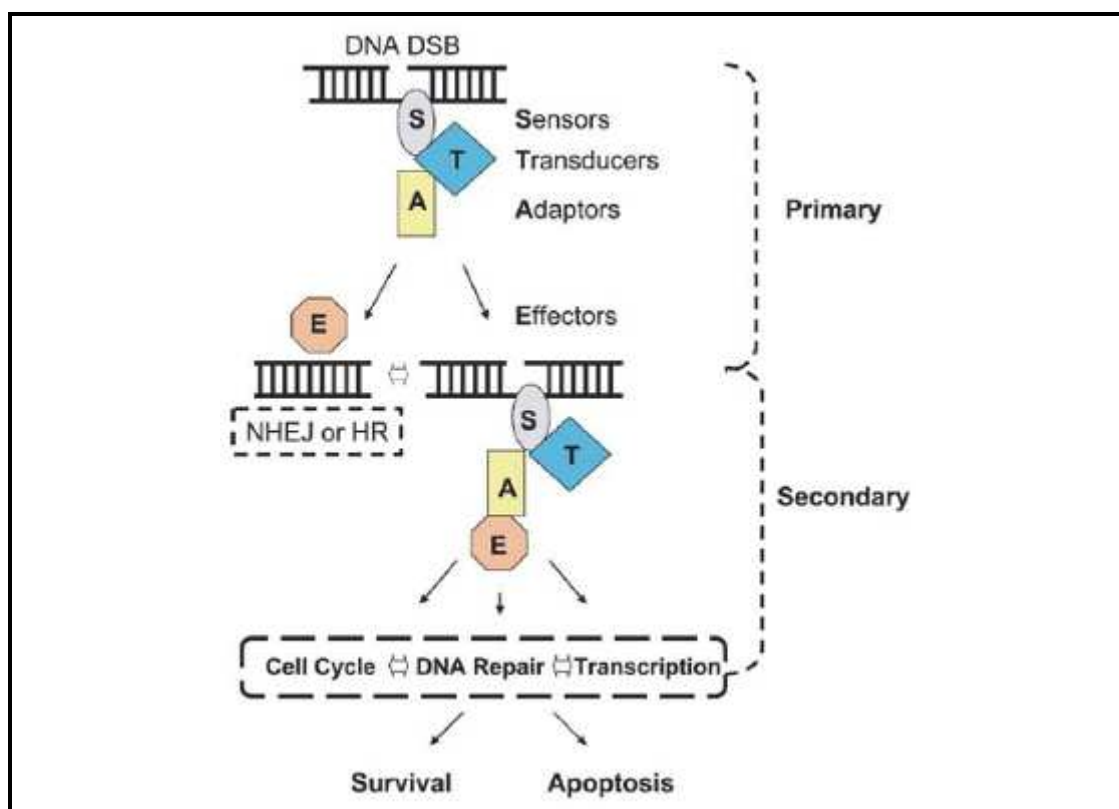
Pęknięcia dwóch nici DNA (*double strand break*, DSB) mogą powstać na skutek działania promieniowania jonizującego), wolnych rodników i błędów w czasie replikacji. Sprawne systemy naprawcze są niezwykle ważne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, a jakiegokolwiek zaburzenia w tych procesach mogą skutkować nieprawidłowościami w trakcie rozwoju embrionalnego, nieprawidłowościami tkanek i organów, a także przedwczesnym starzeniem oraz niestabilnością genomową, która w konsekwencji może prowadzić do nowotworzenia (Hoeijmakers, 2001; Friedberg, 2003).

W komórkach eukariotycznych naprawa DSB odbywa się na drodze niehomologicznego łączenia końców (*non-homologous end joining*- NHEJ) lub rekombinacji homologicznej (*homologous recombination*- HR), przy czym należy zauważyć, iż w przypadku, gdy w wyniku pęknięcia powstają końce niehomologiczne, naprawa na drodze NHEJ może skutkować powstaniem błędów w postaci delecji i/lub insercji.

Sam proces naprawy odbywa się dwuetapowo (Zhou, 2000; Rouse, 2002). W pierwszym etapie białka, które działają jak sensory, odnajdują miejsce

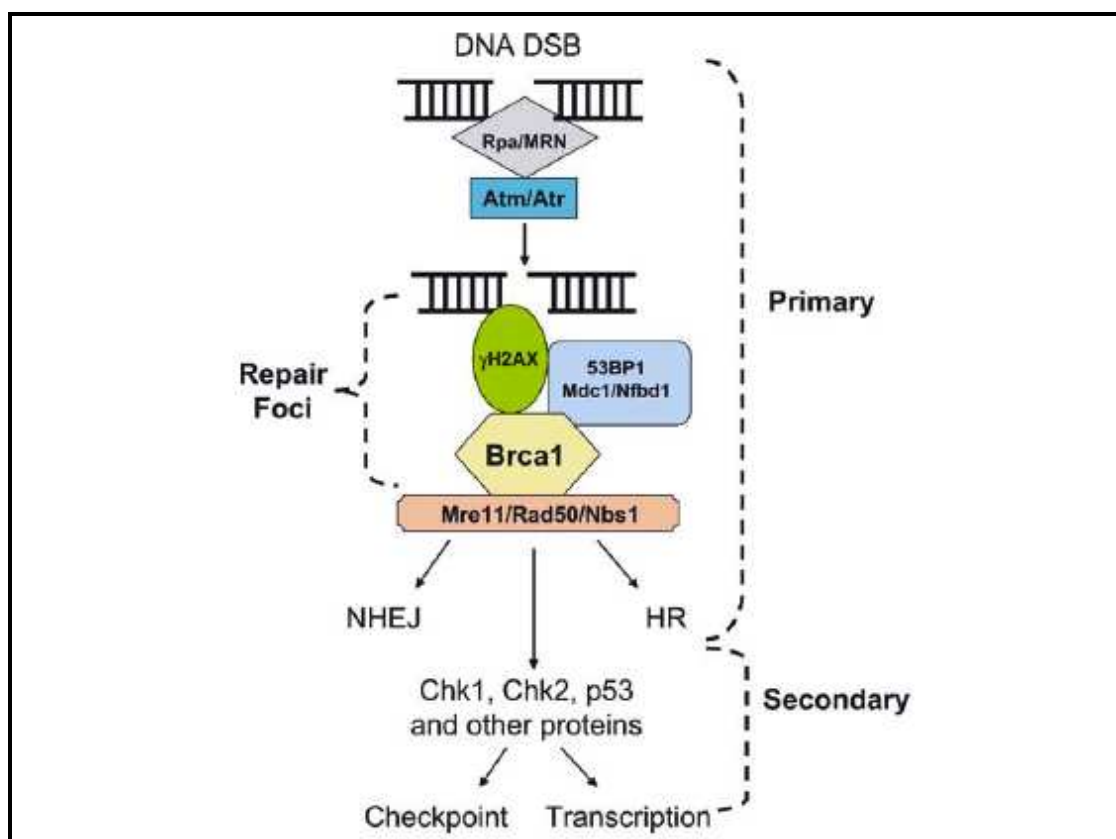
uszkodzenia DNA i za pośrednictwem kolejnych białek, tzw. przekazników i adaptorów, uruchamiają mechanizmy naprawcze.

Jeśli uszkodzenie DNA jest zbyt duże, to informacja o nim jest przekazywana do białek zaangażowanych na drugim etapie naprawy DSB, co wiąże się z opóźnieniem cyklu komórkowego, aktywacją transkrypcji określonych genów oraz zaangażowaniem dodatkowych białek naprawczych. Powyższa kaskada zdarzeń ma na celu ponowienie próby naprawy powstałego uszkodzenia, jeśli również na drugim etapie naprawa nie powiedzie się, komórka zostaje skierowana na drogę apoptozy (Ryc. 5).



Ryc. 5. Dwuetapowy model naprawy DSB (Ting, 2004)

Wiadomo, że BRCA1 bierze udział w systemach naprawczych zarówno na pierwszym jak i drugim etapie naprawy DSB. Jedną z pełnionych przez to białko funkcji jest przekazywanie informacji między nimi - koordynacja tych dwóch etapów (Ryc. 6) (Venkitaraman, 2002; Deng, 2003).



Ryc. 6. Funkcja BRCA1 w koordynacji dwuetapowego procesu naprawy DSB (Ting, 2004)

Wykazano, że w C-terminalnej części BRCA1 znajdują się trzy seryny (p.S1387, p.S1423, p.S1524), kluczowe dla prawidłowej funkcji białka. Są one fosforylowane przez ATM w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące. Zamiana seryny na alaninę w pozycji p.S1423A oraz p.S1524A skutkuje brakiem odpowiedzi BRCA1 na uszkodzenia DNA powstałe w wyniku promieniowania (Cortez, 1999; Gatei, 2001). Natomiast druga z seryn (p.S1423) jest fosforylowana przez ATR w odpowiedzi na promieniowanie UV (Tibbetts, 2000).

BRCA1 bierze także udział w reorganizacji struktury chromatyny w miejscu uszkodzonego DNA. W kilka minut po tym, jak na skutek promieniowania jonizującego dochodzi do uszkodzenia DNA, za pośrednictwem ATM i/lub ATR w histonie H2AX jest fosforylowana seryna w pozycji 139. Wraz z ufosforylowanym H2AX w miejscu uszkodzenia lokalizują się BRCA1 wraz z innymi białkami (kompleks MRE11/RAD50/NBS1, DNA-PKcs, RAD51, 53BP1, ATM, CHK2, etc.) tworząc rodzaj kompleksu naprawczego (Rogakau, 1998; Paull, 2000; Scully i Livingston, 2000; Chan, 2002; Saleh-Gohari, 2005).

Wyniki doświadczeń z wykorzystaniem fibroblastów uzyskanych z mysich embrionów (ang. *mouse embryonic fibroblast*, MEF) wykazały jednoznaczny udział BRCA1 w procesie naprawy podwójnych pęknięć DNA na drodze NHEJ. Linia komórkowa MEF z mutacją w *Brca1* charakteryzowała się obniżeniem aktywności łączenia końców o 50% w porównaniu z linią MEF bez mutacji, a także kilkukrotnym obniżeniem poziomu integracji do genomu retrowirusowego DNA (Zhong¹, 2002; Zhong², 2002). Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach prowadzonych na ludzkich limfoblastach z heterozygotyczną mutacją w genie *BRCA1* (Baldeyron, 2002).

Paull i wsp. (Paull, 1999; Paull, 2001) dowiedli, że BRCA1 reguluje aktywność MRE11, które jest bezpośrednio zaangażowane w NHEJ. Naprawa NHEJ wymaga wycięcia 1-10 nukleotydów w celu zapewnienia właściwego parowania zasad a MRE11 wykazuje aktywność endonukleazy 3'-5' i dlatego jest uważane za jedno z białek uczestniczących w tym procesie.

BRCA2 oddziałuje ponadto z RAD51 (homologiem bakteryjnego RecA, zaangażowanego w rekombinację homologiczną) za pomocą powtórzeń BRC. Natomiast współdziałanie RAD51 z BRCA1 wymaga obecności udziału innych białek, np. BRCA2 (Wong, 1997; Chen, 1998; Wang, 2000). Wykazano, że BRCA1, BRCA2 i RAD51 odgrywają istotną rolę w naprawie DSB oraz utrzymaniu stabilności genomu (Monteiro, 2000; Scully i Livingston, 2000; Welcsh, 2000). W komórkach z nieprawidłowym białkiem BRCA2 zaburzone jest tworzenie kompleksów BRCA2/RAD51 a także ich lokalizacja w jądrze komórkowym w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące. Ponadto w trakcie hodowli komórkowej obserwuje się akumulację aberracji strukturalnych chromosomów (*tri-radial*, *quatri-radial chromosomes*), charakterystycznych dla zespołów z zaburzeniami rekombinacji mitotycznej np. zespół Blooma i Anemia Fanconiego (Patel, 1998). Z kolei w nowotworowych liniach komórkowych, zarówno ludzkich jak i mysich, bardzo często obserwuje się delecję całego eksonu 11 genu *BRCA2*, w wyniku czego białko jest pozbawione powtórzeń BRC i niezdolne do tworzenia heterodimerów z RAD51 (Connor, 1997; Patel, 1998).

Komórki *BRCA2*(+) mają o 1,5-2x zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące i związki powodujące powstawanie wiązań krzyżowych w DNA, jak np. cisplatyna (Morimatsu, 1998; Xia, 2001; Kraakman-van der Zwet, 2002). Mysie

zarodki z nieprawidłowym białkiem Brca1/2 były nie tylko nadwrażliwe na promieniowanie, ale w ich komórkach występowały chromosomowe aberracje liczbowe i strukturalne, powstałe jako bezpośrednia konsekwencja niesprawnych systemów naprawczych (Thompson, 2002).

BRCA1 oddziałuje z kompleksem RAD50-MRE11-NBS1/p95, zaangażowanym w procesy naprawcze NHEJ i HR, jest "koordynatorem" kompleksu BASC (*BRCA1 associated surveillance complex*), a także wchodzi w interakcje z heterodimerem MSH2-MSH6, co sugerowałoby udział BRCA1 w procesach „*mismatch repair*”, a także w przekazywaniu sygnału do zatrzymania cyklu komórkowego lub indukcji apoptozy w przypadku nagromadzenia się błędów w DNA (Zhong, 1999; Monteiro, 2000; Scully i Livingston, 2000; Wang Q, 2000; Welcsh, 2000; Wang Y, 2000; Stracker, 2004).

Kolejną "naprawczą" funkcją białka BRCA1 jest jego rola w usuwaniu uszkodzeń DNA powstałych na skutek działania reaktywnych form tlenu (naprawa sprzężona z translacją) (Gowen, 1998).

Regulacja transkrypcji

BRCA1 odgrywa również istotną rolę w regulacji transkrypcji. Należy zwrócić uwagę, iż samo BRCA1 nie jest czynnikiem transkrypcyjnym, a jedynie wpływa na regulację tego procesu poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi.

Wykazano, że może ono w sposób dodatni regulować transkrypcję poprzez wiązanie się do: p53, STAT1, MYC, JunB, ATF1 (c-AMP dependent transcription factor). Oddziałując z holoenzymem polimerazy RNAII powoduje wzrost ekspresji takich genów jak p21 i GAD45, których produkty biorą udział w zatrzymaniu cyklu komórkowego (Rosen, 2005; Starita, 2006). Wiadomo także, że BRCA1 oddziałuje z represorami transkrypcji np.: CtIP/CtBP, pRB czy deacetylazami histonowymi (*histone deacetylases* - HDACs) (RbAp46, RbAp48, HDAC1, HDAC2) za pośrednictwem powtórzeń BRCT, (Hedenfalk, 2002).

Zdolność BRCA1 do wiązania się z enzymami remodelującymi chromatynę została wykorzystana przy planowaniu nowych terapii raka piersi. I tak zahamowanie funkcji HDACs skutkuje wzrostem acetylacji histonów, a tym

samym wzrostem transkrypcji genów, których produkty są zaangażowane w hamowanie rozwoju guza. A zatem inhibitory HDACs mogły by kompensować braki wynikające z utraty funkcji BRCA1 i być z powodzeniem stosowane w terapii raka piersi. (Llamas,2008).

Regulacja cyklu komórkowego

Białko BRCA1 odgrywa istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego poprzez oddziaływanie z wieloma białkami np. E2F, CDC2 oraz cyklinami - jest hiperfosforylowane w późnej fazie G1 i S, a defosforylowane w fazie M. W doświadczeniach przeprowadzonych na myszach wykryto, że u homozygot z delecją eksonu 11 ($Brca1^{\Delta 11/ \Delta 11}$), które miały zaburzony punkt kontrolny G2/M, nastąpił brak zatrzymania mitozy i w konsekwencji mutacja była przekazywana do komórek potomnych (Welsh, 2000).

Heterodimer BRCA1-BARD1, posiadający funkcję ligazy E3, bierze udział w ubikwitynacji γ -tubuliny (części składowej centrosomu) w pozycji 48 i 344. Wykazano, że obecność mutacji w pozycji 48 γ -tubuliny skutkuje hiperamplifikacją centrosomów, która jest często obecna w komórkach zaawansowanych klinicznie guzów piersi (Hedenfalk, 2002)

3.2.1.1.2. Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2*

Częstość występowania mutacji heterozygotycznych genu *BRCA1* w populacji Kaukaskiej wynosi 1/1000, natomiast nosicielstwa mutacji w genie *BRCA2* - 1/750 (Antoniou, 2002). Dotychczas w genie *BRCA1* opisano ponad 1600, a w *BRCA2* ponad 1800 różnych zmian sekwencyjnych, (Breast Cancer Information Core, <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). Są wśród nich mutacje prowadzące do zmiany ramki odczytu, mutacje nonsensowne, których efektem jest przedwczesna terminacja translacji i powstanie skróconego białka oraz polimorfizmy i warianty sekwencyjne, których znaczenia dla prawidłowego funkcjonowania obydwu białek nie udało się dotychczas określić (*unclassified variants*).

Większość mutacji, zarówno w genach *BRCA1* jak i *BRCA2*, powstała stosunkowo niedawno (mniej niż 100 pokoleń) i cechuje się rodzinnym

występowaniem. Niemniej zauważono, że w niektórych izolowanych populacjach lub grupach etnicznych, częstość występowania określonych mutacji jest znacznie wyższa niż w populacji ogólnej, co jest związane z silnym “efektem założyciela”. Na przykład mutacje 185delAG (c.68_69delAG) w *BRCA1* oraz 6174delT (c.5946delT) w *BRCA2* występują w populacji Żydów Aszkenazyjskich z częstością 1/100 każda (Fodor, 1998). Natomiast w populacji islandzkiej mutacja 999del5 (c.771_775del5) występuje z częstością 0,5% (Johannesdottir, 1996). Mutacja 5382insC (c.5266dupC), która jest stosunkowo częsta wśród Żydów Aszkenazyjskich, występuje także z dużą częstością w wielu populacjach Europy Wschodniej, a wraz z 185delAG (c.68_69delAG) stanowią około 10% wszystkich wykrywanych mutacji w *BRCA1*.

W populacji polskiej, podobnie jak w populacjach Litwy, Niemiec i Rosji, za mutacje założycielskie uważa się wcześniej wymienioną 5382insC (c.5266dupC) oraz zlokalizowaną w eksonie 5 mutację 300T>G (c.181T>G). Inne powtarzające się w populacji polskiej mutacje to: 185delAG (c.68_69delAG), 3819del5 (c.3700_3704del5), 4153delA (c.4034delA) (Sobczak, 1997; Górski, 2000; Grzybowska, 2000; van der Looij, 2000; Jakubowska, 2001; Perkowska, 2003, Ratajska, 2008).

W badaniach mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* coraz większą uwagę zwraca się na istnienie dużych rearanżacji. Ich częstość waha się w różnych populacjach i tak np. w badaniu populacji włoskiej chorych na raka piersi, duże delecje oraz insercje stanowiły blisko 1/3 wszystkich mutacji genu *BRCA1* (Montagna, 2003). Podobnie wysoki odsetek dużych zmian w *BRCA1* wykazano wśród chorych holenderskich – ich częstość wahała się od 27 do 36% (Petrij-Bosch, 1997; Hogervorst, 2003). Natomiast w populacji duńskiej duże rearanżacje wykryto u 3,8% chorych, a w badaniu niemieckim, przeprowadzonym na grupie 1700 chorych, wyniosły one 2,1% (Thomassen, 2006; Engert, 2008). Dotychczas opisano około 80 różnych rearanżacji w *BRCA1* i 14 zmian w genie *BRCA2* (Lim, 2007; Engert, 2008). Tak dużą dysproporcję w liczbie dużych zmian sekwencyjnych pomiędzy *BRCA1* i *BRCA2* można tłumaczyć różnicami w sekwencji tych dwóch genów. Sekwencja *BRCA1* jest szczególnie bogata w powtórzenia Alu, które stanowią około 41% sekwencji intronowej tego genu, natomiast w przypadku *BRCA2* zawartość Alu jest znacznie niższa i wynosi

około 17%. Alu są uważane za „gorące miejsca” (*“hot spot”*) zaangażowane w proces rekombinacji niehomologicznej, która może skutkować powstawaniem mutacji (Kolomietz, 2002; Tancredi, 2004). Duże rearanżacje w *BRCA1* są z reguły dobrze scharakteryzowane i istnieją bezpośrednie przesłanki na udział Alu w ich powstawaniu. Przykładem może być opisana w badaniu niemieckim delecja eksonów od 5 do 7 w *BRCA1*, do której doszło w wyniku rekombinacji niehomologicznej pomiędzy znajdującymi się w intronie 3 AluSx a AluSc w intronie 7 (Preisler-Adams, 2006).

Duże rearanżacje mogą także powstawać na skutek rekombinacji z pseudogenem. Przykładem takiej zmiany jest powstanie chimerycznego genu *BRCA1*, złożonego z eksonów 1A, 1B, 2 należących do pseudogenu *BRCA1* i eksonów 3 do 24 należących do właściwego *BRCA1*. Efektem tej mutacji jest brak promotora oraz kodonu ATG, a w konsekwencji brak białka (Puget, 2002; Hofmann, 2003; Ratajska, 2008).

Zakres badania mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* może być bardzo różny. Na przykład w rodzinach ze znaną mutacją w jednym z genów, badanie ogranicza się do sprawdzenia obecności tej mutacji u pozostałych członków rodziny (tzw. kosegregacja). Wyjątek od takiego modelu postępowania stanowi populacja Żydów Aszkenazyjskich, gdzie ze względu na bardzo wysoką częstość występowania mutacji założycielskich, nawet w rodzinach z pozytywnym wynikiem badania genetycznego, u pozostałych członków rodziny zaleca się sprawdzenie obecności wszystkich trzech mutacji założycielskich (w *BRCA1* - 185delAG (c.68_69delAG), 5382insC (c.5266dupC), a w *BRCA2* – 6174delT (c.5946delT)) (Liede, 1998).

W rodzinach z występującą agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, gdzie badania genetyczne nie zostały dotychczas przeprowadzone, analiza molekularna może obejmować badanie całej sekwencji kodującej *BRCA1/2* w kierunku obecności mutacji punktowych oraz dużych rearanżacji, albo tylko badanie w kierunku wybranych mutacji uważanych w danej populacji za założycielskie lub powtarzające się. Ten drugi schemat postępowania jest jednak możliwy jedynie w przypadku występowania stosunkowo silnego efektu założyciela. Należy jednak pamiętać, że nawet w takich populacjach część mutacji może nie zostać wykryta.

Ostatnim, bardzo ważnym aspektem badania mutacji w *BRCA1/2*, jest wysoka częstość występowania tzw. "wariantów sekwencyjnych" o nieznanym efekcie biologicznym. Ich identyfikacja jest szczególnie kłopotliwa z punktu widzenia poradnictwa genetycznego. W przypadku mutacji powodujących wystąpienie przedwczesnego miejsca terminacji translacji, a co się z tym wiąże powstanie znacznie skróconego białka, interpretacja jest stosunkowo prosta, ponieważ zakłada się negatywny wpływ wykrytej zmiany. Natomiast zmiana typu zmiany sensu, zamiany nukleotydowe w głębi intronu oraz delecje i/lub insercje na końcu genu mogą, ale nie muszą skutkować zmianami w strukturze i funkcji białka.

O ile badanie nad efektem zmian intronowych na proces składania mRNA jest stosunkowo łatwe do przeprowadzenia, to badania nad znaczeniem zmian aminokwasów w białku wymagają szerokich badań populacyjnych - sprawdzenia częstości wykrytej zmiany wśród zdrowych kontroli oraz badań funkcjonalnych. Phelan i wsp. (Phelan, 2005) podjęli próbę klasyfikacji 13 zmian typu *missense* (p.H1402Y, p.L1407P, p.H1421Y, p.S1512I, p.M1628T, p.M1628V, p.T1685I, p.G1706A, p.T1720A, p.A1752P, p.G1788V, p.V1809F, p.W1837R) zlokalizowanych w regionie od aminokwasu 1396. do 1863., obejmującym powtórzenia BRCT. W celu określenia ich wpływu na funkcję *BRCA1* wykorzystali połączenie badań populacyjnych z badaniem aktywacji transkrypcji. W zaproponowanym modelu autorzy przyjęli jako kontrolę negatywną (utrata funkcji) trzy zmiany związane z wysokim ryzykiem wystąpienia rodzinnej agregacji zachorowań na raka piersi/jajnika (p.A1708E; p.M1775R; p.Y1853X) oraz jako kontrolę pozytywną (brak znaczenia klinicznego) neutralny polimorfizm (p.S1613G). Wykazano, że siedem z badanych zmian powoduje drastyczne, zbliżone do kontroli negatywnej, zmniejszenie aktywacji transkrypcji (p.L1407P, p.M1628V, p.T1685I, p.A1752P, p.G1788V, p.V1809F, i p.W1837R), co może sugerować, że są one allelami wysokiego ryzyka. W przypadku czterech innych wariantów (p.H1402Y, p.H1421Y, p.S1512I, p.M1628T) nie zaobserwowano różnic pomiędzy nimi a kontrolą pozytywną, a dla pozostałych dwóch (p.G1706A, p.T1710A) wynik był niejednoznaczny. Również Carvalho i wsp. (2009) podjęli próbę określenia znaczenia wybranych wariantów sekwencyjnych i ich znaczenia dla zachowania prawidłowych funkcji *BRCA1*. W swojej pracy, przy wykorzystaniu badań funkcjonalnych i technik bioinformatycznych, zbadali

siedem niesklasyfikowanych zmian w obrębie sekwencji kodującej genu: delecja eksonów 16 i 17 (nie skutkująca zmianą rakmi odczytu –ang. *in-frame*), insercję cytozyny w eksonie 24 (5673insC- c.5553dupC) oraz pięć zmian *missense* (p.Q1826H, p.K1487R, p.S1613C, p.M1652I, p.V1833M). Na podstawie uzyskanych wyników, zmiany: p.Q1826H, p.K1487R, p.S1613C, p.M1652I uznano za neutralne, wykazano natomiast, że zarówno zmiana *missense* p.V1833M, delecja *in-frame* eksonu 16 i 17 genu *BRCA1* jak również występująca na końcu genu insercja cytozyny, której efektem jest wydłużenie białka o 15 aminokwasów, mają negatywny wpływ na funkcjonowanie białka.

3.2.1.2. Inne geny zaangażowane w występowanie rodzinnej agregacji zachorowań na raka piersi i/lub jajnika

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

Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* stanowią 16-25% wszystkich zmian identyfikowanych w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika (Beggs, 2009; Pharoah, 2008). Kolejne 5% stanowią mutacje identyfikowane w takich genach jak: *TP53*, *PTEN* i *ATM* (Easton, 1999).

Gen *TP53* jest zlokalizowany w chromosomie 17p13.1, składa się z 11 eksonów i koduje białko o długości 393aa i masie 53kD (McBride, 1986). Białko P53 jest zaangażowane w wiele ścieżek sygnałowych, a jego podstawową funkcją jest kontrola proliferacji oraz utrzymanie homeostazy w komórce (Oldenburg, 2007). Mutacje germinalne tego genu są bardzo rzadkie (1/5000) i na świecie zidentyfikowano niewiele ponad 400 rodzin (Malkin, 1990; Easton, 2008).

Zespół Li-Fraumeni, który jest następstwem germinalnych mutacji w *TP53*, cechuje występowanie licznych nowotworów (mięsaki, kostniakomięsaki, nowotwory piersi, białaczki, nowotwory mózgu), a wiele z nich występuje już w wieku dziecięcym.

Prawdopodobieństwo wystąpienia jakiegokolwiek nowotworu złośliwego u nosiciela mutacji w genie *TP53* wynosi 50% przed 30 r.ż. podczas gdy ryzyko populacyjne zachorowania na nowotwór przed 30 r.ż. wynosi 1% (Malkin, 1990).

U chorych z zespołem Li-Fraumeni często (28-56%) obserwuje się zachorowania na raka piersi i/lub jajnika, a szczyt zachorowań przypada pomiędzy 20 a 40 r. ż. (Garber, 1991; Chompert, 2000; Evans, 2002). Wśród rodzin, u których wystąpiła wyłącznie agregacja zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, mutacje w *TP53* są bardzo rzadkie, podobnie u nioselekcjonowanych chorych, u których zachorowanie wystąpiło w bardzo młodym wieku (0,5%) (Borresen, 1992; Rapakko, 2001; de Jong, 2002).

Gen *PTEN* jest zlokalizowany w chromosomie 10q23 i koduje fosfatazę o długości 403aa. Mutacje w tym genie stwierdza się u chorych z zespołem Cowdena. Zespół Cowdena jest niezwykle rzadki - częstość mutacji wynosi 1/250.000. U chorych stwierdza się zmiany śluzowo-skórne, raki piersi, tarczycy, endometrium, a także nerwiaka zwojowego mózdzku (Balls, 2001; Firth i wsp., 2005). Większość nowotworów piersi u osób z zespołem Cowdena występuje po 30-35 r.ż., a wśród heterozygotycznych nosicieli mutacji zaobserwowano przypadki zachorowań na raka piersi (Fackenthal, 2001).

3.2.1.2.2. Geny o umiarkowanej i niskiej penetracji: *BRIP1*, *BARD1* i *CHEK2*

Obok genów o wysokiej penetracji, uwagę badaczy zwróciły geny kodujące białka wchodzące w interakcje z *BRCA1* i *BRCA2*. Interesujące jest, iż pomimo pokrywających się w komórce funkcji (udział w tych samych ścieżkach naprawy DNA), geny te nie wykazują takiej samej penetracji jak *BRCA1/2*. Mutacja germinalna w *CHEK2*, *BRIP1*, *BARD1*, *PALB2* wiąże się jedynie z 2-4x zwiększoną podatnością zachorowania na raka piersi i/lub jajnika (Beggs, 2009).

***BRIP1* (*BRCA1* – interacting protein 1**, inna nazwa to ***BACH1*)** jest zlokalizowany w chromosomie 17q22, w sąsiedztwie genu *BRCA1*. Składa się z 20 eksonów kodujących białko o długości 1249 aminokwasów o aktywności ATPazy i helikazy (5' – 3'). Zawiera siedem silnie konserwatywnych motywów charakterystycznych dla helikaz z rodziny DEAH. W C-terminalnej części (888-1061aa) znajduje się sekwencja oddziałująca z powtórzeniami BRCT w *BRCA1*.

Przeprowadzona analiza mutacji w genie *BRIP1* doprowadziła do identyfikacji dwóch zmian typu „missense”: p.P47A i p.M299I (Cantor, 2001). Późniejsze badania funkcjonalne trzech wariantów sekwencyjnych genu *BACH1* (p.K52R,

p.P47A, p.M299I) wykazały, że powodują one zaburzenie funkcjonowania białka (Cantor, 2004). Ponadto mutację germinálną p.R798X zidentyfikowano u chorych z anemią Fanconiego (wariant J). Jednakże w badaniach Karppinena i wsp. (2003) i Lewisa i wsp. (2005), nie wykazano związku pomiędzy obecnością mutacji w genie *BACH1* a wzrostem ryzyka wystąpienia raka piersi.

Gen *BARD1* (BRCA1 – associated RING domain) jest zlokalizowany w długich ramionach chromosomu 2q34-35 i koduje białko o długości 777aa. *BARD1* posiada dwa powtórzenia BRCT (616 – 653, 743 – 777 aa) homologiczne do *BRCA1* i lokalizuje się razem z nim i *RAD51* w miejscach naprawy DNA. Wykazano, że produkt genu *BRCA1* z mutacją p.C61G nie tworzy heterodimerów z *BARD1*. *BARD1* stanowi część holoenzymu polimerazy RNA II, jak również jest zaangażowany w promowanie apoptozy: nadekspresja białka powoduje śmierć komórki, natomiast mutacja p.E564H w genie *BARD1* powoduje zahamowanie apoptozy. W badaniu fińskim, zidentyfikowano zmianę „missense” p.C577S, której częstość w grupie badanej była wyższa w stosunku do grupy kontrolnej i wynosiła odpowiednio 5,6% i 1,4% ($p=0.005$). Odsetek p.C577S był jeszcze wyższy, kiedy autorzy porównali rodziny z agregacją zachorowań na raka piersi (7,4%) względem zdrowych kontroli (1,4%), $p=0,001$ (Karppinen, 2004)

***CHK2* (*CHK2* – checkpoint kinase 2).** Badania w rodzinach z zespołem Li-Fraumeni wyodrębniły grupę pacjentów, u których nie zidentyfikowano germinálnych mutacji w genie *TP53*, natomiast wykazano nosicielstwo heterozygotycznej mutacji w genie *CHK2* (Ahn, 2004). Gen *CHK2* jest zlokalizowany w chromosomie 22q12.1 i koduje kinazę serynowo/treoninową.

Jak dotąd, w populacji polskiej w genie *CHK2* opisano trzy mutacje germinálne; 1100delC (c.1100delC), IVS2+1G>A (c.444+2G>A), których efektem jest utrata aktywności katalitycznej oraz p.I157T zaburzająca interakcje pomiędzy *CHK2* i *BRCA1*. Ich obecność może predysponować do różnego rodzaju nowotworów, takich jak: obustronny rak piersi, rak piersi u mężczyzn, rak jelita grubego, rak prostaty i rak jajnika (Meijers-Heijboer, 2002; Seppälä, 2003; Cybulski, 2004; de Jong, 2005). Jednakże dotychczas nie udało się uzyskać jednoznacznych danych dotyczących związku powyższych mutacji z rodzinną agregacją zachorowań na nowotwory (Lipton, 2003; Schutte, 2003; Syrjäkowski, 2004).

3.3. Techniki molekularne stosowane w badaniach mutacji genów

Odkrycie kompletnej sekwencji genów *BRCA1* i *BRCA2* postawiło przed badaczami nowe wyzwanie, jakim był dobór odpowiednich metod molekularnych, które znalazłyby zastosowanie w poszukiwaniu mutacji w tak dużych genach.

Oba geny posiadają duży ekson 11 (*BRCA1* – 3425pz, *BRCA2* – 4931pz), a w przypadku *BRCA2* dodatkowo relatywnie duży ekson 10 (1115pz). Ponadto przeważająca większość mutacji prowadzi do powstania skróconego białka (mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu: delecje, insercje lub mutacje nonsensowne). Te dwie cechy charakterystyczne umożliwiły z dużym powodzeniem zastosowanie techniki przedwczesnej terminacji translacji (PTT - *protein truncation test*). Metoda ta pozwala w stosunkowo prosty, szybki i tani sposób zidentyfikować zmiany prowadzące do powstania skróconego produktu białkowego.

W początkowych badaniach, przy pomocy techniki PTT, wykorzystując DNA genomowy, badano sekwencję eksonu 11 *BRCA1* (trzy fragmenty: PTT2, PTT3, PTT4) oraz sekwencje eksonów 10 i 11 *BRCA2* (odpowiednio jeden fragment (PTT10) i cztery fragmenty (PTT11a, PTT11b, PTT11c, PTT11d). Kolejnym krokiem było zastąpienie DNA genomowego cDNA. Pozwoliło to na zamplifikowanie i zbadanie całej sekwencji kodującej obu genów zaledwie w dziewięciu amplikonach (Garvin 1997; Garvin 1998). Wkrótce jednak okazało się, że taki sposób analizy ma poważne ograniczenia. Pierwszym i najważniejszym było odkrycie procesu NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*), który polega na rozpoznawaniu i niszczeniu transkryptów zawierających przedwczesny kodon STOP. Ma to na celu zapobieganie nagromadzeniu skróconych białek potencjalnie niebezpiecznych dla komórki. W rezultacie okazało się, że znaczna część wyników prawidłowych może być w rzeczywistości fałszywie negatywna (Perrin-Vidoz, 2002). Obecnie wiemy, jak skutecznie, poprzez inkubację próbek DNA z puromycyną, blokować proces NMD.

Inną, często wykorzystywaną w badaniu mutacji techniką jest analiza konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP) połączenie technik SSCP i HA (analiza

heterodupleksów), DHPLC (denaturacyjna wysokosprawna chromatografia cieczowa) oraz sekwencjonowanie.

W tradycyjnym SSCP wykorzystuje się różnice w konformacji jednoniciowego DNA (ssDNA). Nawet pojedyncza zmiana nukleotydowa może wpłynąć na konformację, a tym samym na migrację ssDNA w żelu. Technika ta ma jednak poważne ograniczenia, gdyż nie wszystkie zasady biorą udział w tworzeniu konformacji przestrzennej - a zatem nie każda mutacja spowoduje zmianę ułożenia nici i szybkości migracji w żelu. Kolejnym utrudnieniem jest wrażliwość szybkości migracji na zmiany temperatury, wilgotności, składu buforu do elektroforezy itp.

W wieloośrodkowym badaniu przygotowanym przez *Breast Cancer information core* (BIC), mającym na celu porównanie czułości poszczególnych metod, laboratoria otrzymywały nieoznaczone próbki z mutacją w *BRCA1* lub *BRCA2*, a ich zadaniem była prawidłowa identyfikacja mutacji. SSCP okazało się być metodą skuteczną w 72% (Eng, 2001). Alternatywą dla SSCP jest połączenie SSCP/HA. Technika ta opiera się na jednoczesnej analizie ssDNA i dsDNA z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej (Kozłowski, 2001). SSCP/HA ma wyższą czułość, a dodatkowo zastosowanie sekwenatora automatycznego pozwala na zachowanie optymalnych warunków rozdziału.

W roku 1995 Oefner i Underhill zaprezentowali analizę mutacji z wykorzystaniem DHPLC (Huber, 1993; Oefner, 1995). Technika ta okazała się być znacznie czulszą od innych metod pośrednich (SSCP, HA itp.). Jest ona oparta na wykrywaniu heterodupleksów w produktach reakcji PCR za pomocą jonowymiennej chromatografii odwróconych faz. Częściowa denaturacja termiczna w gradiencie acetonitrylu pozwala na utworzenie hybryd pomiędzy nicią DNA z mutacją i nicią bez mutacji. Powstałe w ten sposób heterodupleksy mają krótszy czas retencji na kolumnie w porównaniu do homodupleksów, co jest uwidaczniane w postaci dodatkowych pików lub zmienionego wzoru pików na chromatogramie. We wspomnianym już badaniu BIC skuteczność DHPLC potwierdziła się w 95-100% analiz (Eng, 2001).

Alternatywą dla metod pośrednich jest sekwencjonowanie bezpośrednie. Jego niewątpliwą zaletą jest dokładna charakterystyka wykrytej zmiany, jednakże jest ono stosunkowo czasochłonne i kosztowne.

W populacjach, w których występuje silny efekt założyciela, możliwe jest opracowanie prostych testów opartych na technice PCR, które pozwolą szybko, przy minimalnym nakładzie kosztów, zanalizować dużą liczbę próbek. Przykładem może być identyfikacja określonych mutacji z wykorzystaniem RFLP (polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych), jednakże warunkiem jest dobranie odpowiedniego enzymu restrykcyjnego lub też ASA-PCR (amplifikacji allelo-specyficznej). Możliwe jest również zaprojektowanie zestawu, gdzie dzięki zastosowaniu kilku par starterów możemy przeprowadzić identyfikację kilku mutacji w jednej próbce w bardzo krótkim czasie. Niewątpliwym ograniczeniem tej metody jest występujące w danej populacji szersze spektrum mutacji.

W trakcie ostatniej dekady dużo miejsca poświęcono badaniu dużych rearanżacji genowych. Jak wspomniano wcześniej, w niektórych populacjach mogą one stanowić nawet do 30% wykrywanych mutacji. Metodą, która zasługuje na szczególną uwagę, jest MLPA (wielokrotna amplifikacja zależna od ligacji fragmentów). MLPA jest metodą ilościową opracowaną przez holenderską firmę *MRC Holland* i pozwala na jednoczesną analizę do 45 sekwencji. Do określonej sekwencji badanego genu przyłącza się sonda. Jeśli hybrydyzacja zaszła poprawnie, jest ona ligowana, a następnie amplifikowana w trakcie reakcji PCR. Podczas elektroforezy kapilarnej dochodzi do rozdzielenia poszczególnych fragmentów, a dzięki zastosowaniu startera znakowanego fluorescencyjnie możliwe jest oznaczenie ilości każdego z nich. Redukcja sygnału o 30-50% świadczy o obecności delecji, natomiast zwiększenie do 130-150% o duplikacji. Metoda ta jest czuła, prosta w zastosowaniu oraz stosunkowo tania.

3.4. Podsumowanie

Pomimo, iż od momentu wykrycia genów *BRCA1* i *2* minęło ponad 15 lat, dotychczas nie udało się w pełni poznać ani ich funkcji, ani ścieżek sygnałowych, w które ich produkty są zaangażowane. Ostatnie lata przyniosły nie tylko odkrycie nowych białek będących elementami wspomnianych kaskad sygnałowych, ale także nowe informacje dotyczące bezpośrednio charakteru mutacji wykrywanych w genie *BRCA1*. Okazało się, że zmiany pierwotnie uważane dotąd za mało istotne dla zachowania prawidłowych funkcji białka powodują drastyczny spadek aktywacji transkrypcji tego genu.

Tak więc zarówno duży rozmiar obu genów, jak również problemy z interpretacją znaczenia mutacji nie powodujących znacznego skrócenia produktu białkowego, sprawiają iż badania molekularne w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika są kosztowne jak i czasochłonne. Dlatego też ważne jest opracowanie właściwej strategii badania mutacji, która powinna obejmować: jak najszerszą analizę genów *BRCA1/2* lub, jeśli to niemożliwe, powinna ograniczać się do możliwie najdokładniej wyselekcjonowanego panelu mutacji, charakterystycznych dla badanej populacji. Zastosowanie metody powinny zapewniać optymalną czułość badania i szybkość otrzymania wyniku. Ze względu na fakt iż tylko właściwie zaprojektowane badanie molekularne pozwoli na sprawną i wiarygodną analizę tych genów, w niniejszej rozprawie przeprowadzono badanie mutacji w całej sekwencji kodującej genów *BRCA1* i *BRCA2*, a także podjęto próbę określenia częstości występowania dużych rearanżacji tychże genów w rodzinach z agregacją raków piersi i jajnika.

W niniejszej pracy badanie mutacji punktowych przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch technik pośrednich: PTT i DHPLC. Wybór ten był potraktowany ich czułością, szybkością wykonania analiz, a także, co jest istotne, stosunkowo niskimi kosztami wykonania badań. Natomiast analizę dużych rearanżacji przeprowadzono z wykorzystaniem techniki MLPA, którą cechuje łatwość wykonania oraz prostota analizy i interpretacji otrzymanych wyników. Połączenie wyżej wymienionych metod biologii molekularnej pozwoliło na przeprowadzenia kompletnej i wiarygodnej analizy mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*.

4. CELE

1. Określenie częstości oraz spektrum mutacji punktowych we wszystkich eksonach kodujących genów *BRCA1* i *BRCA2* u chorych z rodzinie występującymi zachorowaniami na raka piersi i/lub jajnika.
2. Przeprowadzenie analizy dużych rearanżacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* w grupie pacjentów z powyższych rodzin, u których wykluczono występowanie mutacji punktowych w obu tych genach.
3. Przeprowadzenie analizy kosegregacyjnej w rodzinach z wybranymi mutacjami w genach *BRCA1/2*.
4. Określenie związku wybranych parametrów klinicznych chorych z rakiem piersi i/lub jajnika z obecnością i rodzajem germinalnych mutacji w genach *BRCA1/2*.

5. MATERIAŁ I METODY

5.1. Materiał

Badanie zostało przeprowadzone w grupie 155 kobiet z silną rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika będących pod opieką onkologicznej poradni genetycznej (dr n. med. Izabela Brożek) w Wojewódzkim Centrum Onkologii w Gdańsku w latach 1999–2007 (dyrektor: dr n. med. Ewa Solska), bądź będących pacjentkami Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii AMG (kierownik: prof. dr hab. n. med. Jacek Jassem).

Wszystkie osoby włączone do badania wyraziły pisemną zgodę na udział w nim po zapoznaniu się z projektem rozprawy zaaprobowanym przez Terenową Komisję Etyki Badań Naukowych przy AMG (NKEBN/86/2001).

W celu określenia częstości występowania w populacji ogólnej wariantu 10323delCins11 (c.10095Cins11) wykonano badania w grupie kontrolnej, którą stanowiło 1240 anonimowych próbek (wysuszonych plam krwi) pozostałych po przesiewowych badaniach nosicielstwa mutacji genu fenyloketonurii u noworodków z województwa pomorskiego. Powyższy materiał został uzyskany za pośrednictwem Pracowni Badań Przesiewowych i Hormonalnych Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie (kierownik: dr n. med. Mariusz Ołtarzewski).

5.1.1. Kryteria rodowodowe

Pacjenci, którzy zostali zakwalifikowani do badania spełniali jedno z poniższych kryteriów rodowodowych dotyczących krewnych I^o oraz II^o:

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

W pierwszej kolejności do badania kwalifikowano osoby z rozpoznaniem choroby nowotworowej. W przypadku braku możliwości wykonania badania u osoby chorej, kwalifikowano zdrowe najbliższe krewne.

5.1.2. Charakterystyka kliniczna badanych kobiet

Spośród 155 pacjentek zakwalifikowanych do badania 95 pochodziło z rodzin, w których występowała agregacja zachorowań na raka piersi (w tym w trzech z nich występował przypadek zachorowania u mężczyzny), 55 z rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika oraz pięć z rodzin, w których występowały zachorowania wyłącznie na raka jajnika. Średni wiek zachorowania na raka piersi wynosił 45,6 lat (zakres od 26 do 70 lat), a na raka jajnika 48,9 (zakres od 29 do 73 lat) .

5.1.3. Aparatura

Tab. 2. Zestawienie stosowanej aparatury.

· Sekwencjator automatyczny ABI PRISM 310 · Sekwencjator automatyczny ABI PRISM 3100 · Termocykler GeneAmp PCR System 2400 · Termocykler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
· System archiwizacji żeli Gel Doc 2000 z oprogramowaniem Quantity One · Zasilacz PowerPac 3000 · Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej Mini-Protean 3 · Suszarka do żeli 583	Bio-Rad
· Wirówka 5810R · Wirówka 5804 · Wirówka MiniSpin	Eppendorf
· Worteks	Ika
· Lodówka z zamrażarką	
· Ciepłarka	Laborgeräte Berlin
· Termocykler PTC-200 DNA Engine	MJ-Research
· GeneQuant RNA / DNA Calculator	Pharmacia
· Spektrofotometr NanoDrop – 1000	NanoDrop Technologies
· System WAVE 3500A	Transgenomic Ltd

5.1.4. Odczynniki

Tab. 3. Zestawienie stosowanych odczynników.

• Zestaw Exterminator (250) • Zestaw Clean-up (250)	A&A Biotechnology
• Radioaktywny marker wielkości-¹⁴C-methylated proteins	Amersham
• 10x EDTA bufor • 5x Sequencing Buffer • BigDye Terminator Kit wersja 3.1 • Kapilara 47cm x 50µm • Polimer POP-4 • Marker wielkości GeneScan-500 TAMRA	Applied Biosystems
• 30% akrylamid/bis (37,5:1) • Akrylamid/bis 37,5:1	Bio-Rad
• Marker wielkości M100-500	DNA Gdańsk II
• Trizol • Zestaw do syntezy cDNA Superscript™ II	Gibco BRL
• β-merkaptotoetanol • Glicerol • Glicyna • Fenol, roztw. nasycony, pH 6.6, z buforem do kalibracji • Ksylen • Proteinaza K • [³⁵S]-metionina	ICN
• Taq Polimeraza DNA (5U/µl) • Pfu Taq Polimeraza DNA (5U/µl) • 10 x bufor • roztwór 25mM MgCl₂ • dNTPs zestaw 100 µM	MBI, Fermentas
• Izopropanol • Chloroform	Merck

· Zestawy do analizy dużych rearanżacji (P002, P045, P087)	MRC Holland
· Alkohol etylowy 96%	POCh Gliwice
· Startery	IBB PAN, Warszawa
· TNT® T7 Quick Master Mix	Promega
· Agaroz	Prona
· Bromek etydyny · Chlorek amonu · EDTA · TRIS BASE · Octan sodu · Proteinaza K · Kwas borowy · Sacharoza · Xylene cyanol · Bromophenol blue · Chlorek sodu · Wodorowęglan potasu · Formamid · SDS · APS · TEMED	Sigma

5.1.5. Roztwory

Tab. 4. Zestawienie i składy stosowanych roztworów.

· Bufor 5xRBC (500 ml)	· NH_4Cl 20,73 g · KHCO_3 2,3 g · 0,5 M EDTA, pH 8 10 ml
· Bufor do proteinazy K	· NaCl 100 mM · Tris HCl, pH 8 10 mM · EDTA, pH 8 25 mM · SDS 0,5%
· Bufor (4x) do żelu rozdzielającego (100 ml)	· Tris base 18,17 g · 10% SDS 4 ml
· Bufor (4x) do żelu zagęszczającego (100 ml)	· Tris base 6,06 g · 10% SDS 4 ml
· Bufor SDS (10x) do elektroforezy białek (1000 ml)	· Tris base 30 g · Glicyna 144 g · 10% SDS 100 ml
· Roztwór roboczy proteinazy K	· 20mg/ml
· 6x bufor obciążający (50 ml)	· bromophenol blue 0,25% · xylene cyanol 0,25% · sacharoza 40%
· Bufor obciążający z SDS (9,5 ml)	· Glicerol 2 ml · 10% SDS 2 ml · bromophenol blue 0,25 mg · 4x bufor do żelu zagęszczającego 2,5 ml
· 50x TAE (1000 ml)	· Tris base 242 g · Lodowaty kwas octowy 57,1 ml · 0,5 M EDTA, pH 8.0 100 ml
· 10% SDS (100ml)	· 20g SDS
· Roztwór roboczy akrylamidu (7%) (100 ml)	· 50x TAE 1,9 ml · 30% akrylamid/bis (37,5:1) 23,5 ml

• Roztwór roboczy bromku etydyny (200ml)	• 20μl bromku etydyny (10mg/ml) • 1x TAE
• Żel zagęszczający	• ddH₂O 12,5 ml • 30% akrylamid/bis (37,5:1) 2,5 ml • bufor (4x) do żelu zagęszczającego 5 ml
• Żel rozdzielający (15%)	• ddH₂O 15 ml • 30% akrylamid/bis (37,5:1) 15 ml • Bufor (4x) do żelu rozdzielającego 10 ml
• Żel rozdzielający (17,5%)	• ddH₂O 12,5 ml • 30% akrylamid/bis (37,5:1) 17,5 ml • Bufor (4x) do żelu rozdzielającego 10 ml

5.2. Metody

W Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wykonano analizę DHPLC oraz analizę MLPA dużych rearanżacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*. Natomiast w zagranicznych ośrodkach partnerskich wykonano analizę PTT oraz analizę DHPLC u części badanych pacjentek (Katedra Onkologii, Uniwersytet w Lund, Szwecja; Instytut Chemii Biomolekularnej, Uniwersytet w Sassari, Włochy)

5.2.1. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej

Do izolacji DNA zastosowano metodę z użyciem proteiny K, ekstrakcji fenol/chloroform i precypitacji etanolem (Tab.5).

Tab. 5. Protokół izolacji DNA ze świeżej krwi żyłnej

1. 10ml krwi żyłnej, pobranej do probówek z EDTA, przenieść do probówek typu Falcon.
2. Wirować przez 10 min. (3220 x g, 4°C), a następnie odciągnąć osocze.
3. Pozostały na dnie probówki osad elementów morfotycznych krwi zalać 10ml buforu lizującego (1xRBC).
4. Inkubować w temp. +4°C przez 10 -15 min.
5. Wirować przez 10 min. (3220 x g, 4°C), po czym zlać supernatant.
6. Płukanie (5ml 1xRBC) i wirowanie (3220 x g, 4°C) powtarzać do momentu uzyskania białego osadu.
7. Do uzyskanego osadu dodać 5ml NaCl/EDTA, 500µl 10% SDS i 12µl proteiny K (20 mg/ml)
8. Inkubować przez noc w 37°C.
9. Do strawionego materiału dodać 3ml fenolu (pH 7.9), wytrząsać przez 15-20 min i wirować (15 min., 4°C, 3220 x g).
10. Górną warstwę przenieść do nowej probówki.
11. Dodać 5ml chloroformu
12. Wytrząsać (15-20 min) i wirować (10 min, 4°C, 3220 x g) - Etap ten powtórzyć dwukrotnie.
13. Górną warstwę przenieść do nowej probówki.
14. Dodać 5ml izopropanolu i inkubować przez noc w -20°C.
15. Wytrącone, w formie "kłaczków", DNA przenieść do probówki typu Eppendorf.
16. Zalać 1ml 70% etanolu i wirować (10 min., 4°C, 20817 x g).
17. Supernatant odciągnąć.
18. Powtórzyć punkty 16 i 17.
19. Osad wysuszyć pod wyciągiem i zawiesić w 300µl sterylnej wody.

5.2.2. Izolacja DNA z tkanek nowotworowych zatopionych w parafinie

Tab. 6. Protokół izolacji DNA z tkanki nowotworowej zatopionej w parafinie

1. 20 - 30 skrawków (grubości 5µm) tkanki nowotworowej zatopionej w parafinie, przenieść do probówek typu Falcon.
2. Dwukrotne płukać (1ml ksylenu) i wirować przez 15 minut (20800 x g, 20°C).
3. Usunąć warstwę ksylenu i przepłukać osad 1ml etanolu, a następnie wirować jw.
4. Powtórzyć płukanie etanolem, następnie wirować przez 15 minut (20800 x g, 20°C), usunąć etanol i pozostawić do wysuszenia przez ok. 30 minut.
5. Do uzyskanego osadu dodać 500 µl mieszaniny trawiącej [20%SDS, proteinaza K (20 mg/ml) i bufor TE (pH 9)] i inkubować (56°C) do całkowitego strawienia tkanki.
6. Dodać 500 µl fenolu, worteksować, a następnie wirować przez 10 minut (20800 x g, 20°C).
7. Supernatant przenieść do nowej probówki, a następnie dodać jedną objętość chloroformu, zworteksować i wirować jw.
8. Górną warstwę przenieść do nowej probówki, dodać dwie objętości etanolu i 1/10 objętości 3M octanu sodu.
9. Trzymać probówki w temp. -20°C przez 30 minut
10. Wirować przez 20 minut (20800 x g, 4°C).
11. Usunąć supernatant, płukać osad 75% etanolem (1ml), wirować jw.

5.2.3. Izolacja RNA z limfocytów krwi obwodowej

Izolację RNA przeprowadzono według metody opracowanej przez Chomczyńskiego i Sacchi (Tab.7).

Tab. 7. Protokół izolacji RNA wg Chomczyńskiego i Sacchi (Chomczynski, 1987).

1. Do 1ml krwi żyłnej dodać trzy objętości buforu lizującego (1xRBC).
2. Inkubować w temp. 4°C przez 10 -15 minut.
3. Wirować przez 8 min. (1500 x g, 4°C), a następnie usunąć supernatant.
4. Osad zalać 250µl 1xRBC.
5. Całość przenieść do probówki typu Eppendorf i dodać 1ml Trizolu - na tym etapie można przerwać izolację i przechowywać próbki w temp. -80 °C.
6. Inkubować w temperaturze pokojowej przez około 10 minut.
7. Dodać 200µl chloroformu, energicznie wytrząsnąć i inkubować 5 min. w temp. pokojowej.
8. Wirować przez 15 min. (14 000 x g, 4°C), po czym zebrać fazę wodną i przenieść do nowej probówki.
9. Dodać 500µl izopropanolu i inkubować 10 min. w temp. pokojowej.
10. Wirować przez 10 min. (20 000 x g, 4°C), usunąć supernatant.
11. Osad płukać 1ml 75% etanolu, zwirować (12 000 x g, 4°C), a następnie wysuszyć.
12. Osad rozpuścić w 50µl wody wolnej od RNaz.

5.2.3.1. Synteza cDNA

Do syntezy cDNA użyto zestawu Superscript™ II. Protokół postępowania był zgodny z ulotką załączoną przez producenta.

5.2.4. Test przedwczesnej terminacji translacji

Metoda PTT (ang. *Protein Truncation Test*) została wykorzystana do analizy mutacji w genie *BRCA1* (ekson 11) oraz *BRCA2* (ekson 10 i 11). Metodą tą zanalizowano łącznie 60 próbek. Szczegółowy protokół postępowania przedstawiono poniżej.

5.2.4.1. Startery zastosowane w analizie PTT

Reakcję PCR przeprowadzono z zastosowaniem par starterów, gdzie każdy ze starterów sensownych był rozszerzony o 34 nukleotydową sekwencję promotora faga T7, eukariotyczną sekwencję inicjacji translacji TIS (ang. *translation initiation sequence*) wraz z kodonem START (Tab. 8).

Tab. 8. Schemat budowy startera *forward* zastosowanego w amplifikacji fragmentów techniką PCR

Promotor transkrypcji T7	Łącznik	Eukariotyczna sekwencja inicjacji translacji (TIS) wraz z kodonem startu	Sekwencja komplementarna do sekwencji genu
TAATACGACTCACTATAGG	AACAGA	CCACC ATG G	nnn

Ekson 11 genu *BRCA1* został podzielony na trzy fragmenty, nazwane odpowiednio PTT2, PTT3 i PTT4. W przypadku genu *BRCA2*, dla eksonu 10 amplifikowano jeden fragment (PTT10), a dla eksonu 11 cztery fragmenty (PTT11a, PTT11b, PTT11c, PTT11d). Sekwencje starterów i warunki reakcji przedstawiono w tab. 9 - 11.

Tab. 9. Sekwencje starterów eksonu 11 genu *BRCA1* i eksonów 10 oraz 11 genu *BRCA2* wykorzystane w badaniu PTT

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'-3'	Długość produktu	Referencje
BRCA1			
11A_f	* CTTGTGAATTTTCTGAGACGG	1332	Hogervorst, 1995
11A_r	ATGAGTTGTAGGTTTCTGCTGTG		
11B_f	* ACAATTCAAAAGCACCTAAAAAG	1462	
11B_r	AACCCCTAATCTAAGCATAGCATTC		
11C_f	* CACCACTTTTTCCCATCAAGTC	1151	Hogervorst, 1995; Plummer, 1995
11C_r	GTTTGAATCCATGCTTTGCTC		
BRCA2			
10_f	* CGCTTCTGTTTTATACTTTAACAGG	1196	Hakansson, 1997
10_r	GGAATCGTCATCTATAAAAC		
11A_f	* GTTTATTGCATTCTTCTGTG	1461	
11A_r	TGACTTCCTGATTCTTCTAA		
11B_f	* AATGGGCAGGACTCTTAGGT	1469	
11B_r	TTTCATCACGTTCTGGGTTGT		
11C_f	* CTACTAAAACGGAGCAAAAT	1452	
11C_r	TCGTAACAACCTGCCATAAT		
11D_f	* ATGCATACCCACAAACTGTA	1516	
11D_r	CCAAGTCTACTGAATAAACAC		

(*)Koniec 5' został rozszerzony o sekwencję podaną w tabeli 6.

5.2.4.2. Amplifikacja fragmentów DNA techniką PCR

Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 25 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli poniżej.

Tab. 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów *BRCA1* (ekson 11) i *BRCA2* (eksony 10 i 11)

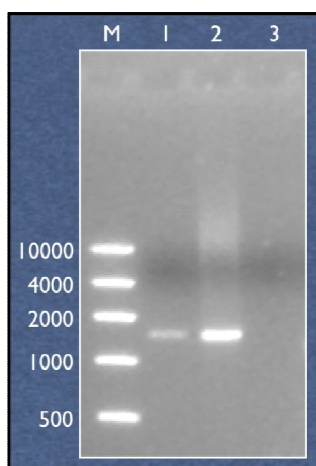
Składnik mieszaniny:	objętość/próbkę [μ l]
Woda	16,6
10xPCR bufor	2,5
MgCl ₂ [25mM]	2,5
dNTP mix [10 mM]	0,25
Mieszanina starterów [10 μ M]	2
Polimeraza Taq [5U/ μ l]	0,15
DNA [50 ng/ μ l]	1

Każdorazowo w reakcji PCR stosowano kontrolę negatywną, gdzie do próbki zamiast DNA, dodawano identyczną objętość wody destylowanej.

Tab. 11. Warunki amplifikacji badanych fragmentów genów

Etap	Tem.	Czas (min)	Liczba cykli
wstępna denaturacja	94°C	7,00	-
denaturacja	94°C	0,30	40 cykli
przyłączanie starterów	55°C	0,30	
wydłużanie	72°C	1,30	
końcowe wydłużanie	72°C	7,00	-

W celu potwierdzenia obecności zamplifikowanego fragmentu produkt reakcji PCR rozdzielano na 1% żelu agarozowym, w 1xTAE (Ryc. 7).



Ryc. 7. Przykładowy żel agarozowy, wybarwiony bromkiem etydyny.

Na żelu uwidocznił się zampłifikowany fragment eksonu 11 genu BRCA1 (PTT3) w dwóch próbkach DNA o numerach brca_12 i brca_23.

M - marker wielkości (wartości wyrażone w pz); 1, 2 - zampłifikowane fragmeny genu, 3-kontrola negatywna.

5.2.4.3. Translacja *in vitro* i rozdział elektroforetyczny produktów białkowych.

W celu przeprowadzenia reakcji translacji *in vitro* mieszano po 2,5 µl zestawu TnT®T7 oraz 0,25 µl metioniny znakowanej izotopem siarki [³⁵S] a następnie mieszaninę dodawano do 2µl produktu PCR. Tak przygotowaną próbkę inkubowano w temp. 30°C przez 90 min. . Kolejnym etapem było przygotowanie produktu białkowego do rozdziału elektroforetycznego; w tym celu do każdej z próbek dodawano 20µl mieszaniny buforu obciążającego z SDS i β-merkaptioetanolu (w stosunku: 20:1,4). Marker wielkości znakowany izotopem węgla [¹⁴C] mieszano z buforem obciążającym z SDS w stosunku 1:2. Tak przygotowane próbki denaturowano przez pięć min. w temp. 95°C i natychmiast schładzano do temp. 4°C.

5.2.4.3.1. Przygotowane żelu poliakrylamidowego i warunki rozdziału elektroforetycznego.

Elektroforezę białek prowadzono z zastosowaniem aparatów do elektroforezy Mini-Protean 3. W tym celu przygotowywano specjalne dwufazowe żełe o wymiarach 100 x 70 x 0,7mm.

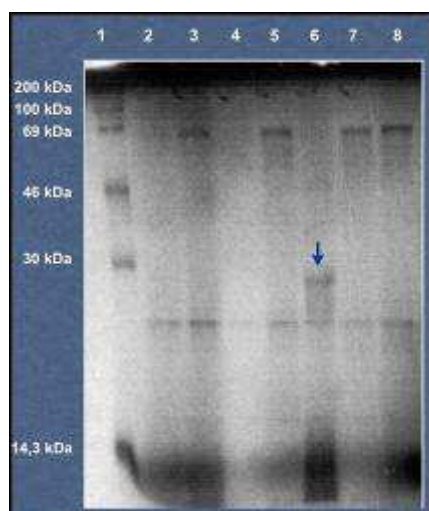
Do 4ml żelu rozdzielającego (15% dla fragmentów: PTT 2, 3, 4, 11a, 11b, 11c, oraz 17,5% dla fragmentów PTT 10, 11d) dodawano 40μl 20% APS-u i 5μl TEMED-u. Żel wylewano do wysokości około 2cm od górnej krawędzi szybki i niezwłocznie pokrywano warstwą 0,1% SDS-u, a następnie pozostawiano do polimeryzacji przez 10 min.. Po tym czasie usuwano SDS, powierzchnię żelu przemywano wodą, a następnie jednokrotnie stężonym buforem do żelu zagęszczającego. Ostatnim etapem było zmieszanie 2ml żelu zagęszczającego z 14μl 20%APS-u i 5μl TEMED-u i wylanie mieszaniny na powierzchnię wcześniej spolimeryzowanego żelu rozdzielającego. Warstwę żelu zagęszczającego z umieszczonym w niej grzebieniem pozostawiano do polimeryzacji przez co najmniej 15 min., czyli do czasu uformowania studzienek.

Na tak przygotowany żel nakładano po około 10μl produktu. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze SDS (1x), przy natężeniu 15mA do czasu, gdy bufor obciążający był na wysokości żelu zagęszczającego i przy natężeniu 30mA, gdy osiągnął on poziom żelu rozdzielającego.

Po zakończonym rozdziale odcinano warstwę żelu zagęszczającego, żel rozdzielający umieszczano na bibule, przykrywano folią PCV i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 80°C przez ok. godzinę. Wysuszony żel umieszczano następnie na całą noc w kasie z kliszą rentgenowską, którą wywoływano na drugi dzień.

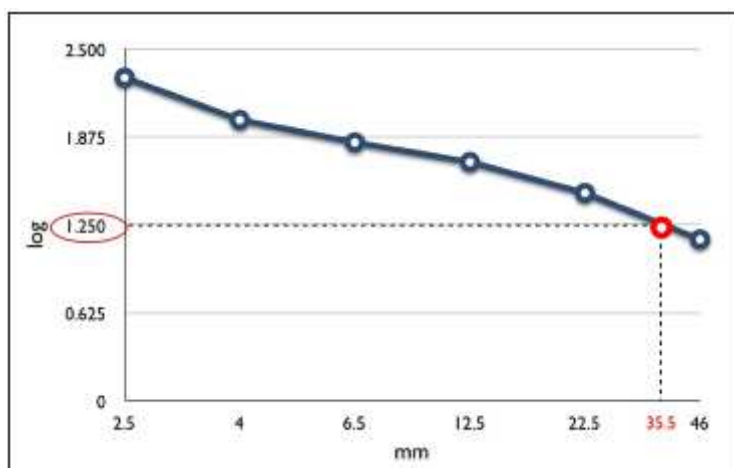
5.2.4.4. Analiza PTT

Sposób analizy PTT przedstawiono na niżej zamieszczonym przykładzie. Analiza autoradiogramu wykazała obecność prążka świadczącego o istnieniu dodatkowego, krótszego produktu białkowego (Ryc.8).



Ryc. 8. Obraz autoradiogramu. Strzałką zaznaczono ścieżkę z dodatkowym prążkiem.

Pierwszym etapem analizy było określenie odległości poszczególnych prążków markera wielkości od studzienki. Każdemu prążkowi markera przyporządkowana jest określona, stała wartość logarytmiczna. Uzyskane wartości zapisywano w tab. 12, a na ich podstawie sporządzano wykres (Wykres 1). Przy pomocy tak wykonanego wykresu określano przybliżoną wartość logarytmiczną dla dodatkowego prążka, a następnie obliczano dla tej wartości logarytmu dziesiętny.



Wykres 1. Zależności pomiędzy odległością poszczególnych prążków od studzienki, wyrażoną w milimetrach, a ich wartością logarytmiczną. Na wykresie kolorem czerwonym zaznaczono pozycję odpowiadającą dodatkowemu prążkowi jak również odpowiadającą jej wartości logarytmu.

Tab. 12. Odległości poszczególnych prążków markera od studzienki i odpowiadające im stałe wartości logarytmiczne.

wielkość białka (kDa)	wartość logarytmiczna	odległość (mm)
200	2,3	2,5
100	2	4
69	1,84	6,5
46	1,7	12,5
34	1,48	22,5
14,3	1,15	46

Następnym etapem było obliczenie długości produktu obserwowanego w postaci dodatkowego prążka, a ostatecznie określenie przybliżonego miejsca mutacji, dobranie odpowiednich starterów w celu powielenia produktu i przeprowadzenia reakcji sekwencjonowania.

$$35.5 \text{ mm} > 1,25$$

$$x(\text{kDa}) = 10^{1,25}$$

$$x = \mathbf{17,8 \text{ KDa}}$$

liczba aminokwasów:

$$17,8 \text{ KDa} / 0,12 = \mathbf{148 \text{ aa}}$$

liczba par zasad:

$$148 \times 3 = \mathbf{445 \text{ pz}}$$

Otrzymaną wartość liczbową dodawano do pozycji w której znajdował się starter *forward*. W ten sposób otrzymywano przybliżone miejsce mutacji, które następnie sekwencjonowano w celu określenia dokładnej pozycji i charakteru zaobserwowanej zmiany. W przedstawionym przypadku początek właściwej sekwencji startera *forward* był zlokalizowany w pozycji: 1921, a więc przybliżone miejsce mutacji to:

$$1921\text{pz} + 445 \text{ pz} = 2366\text{pz}$$

5.2.5. Wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa

Wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (ang. *denaturing high performance liquid chromatography* - DHPLC) została wykorzystana do analizy mutacji w obrębie całej sekwencji kodującej genów *BRCA1* i *BRCA2* w grupie 95 pacjentek z rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, jak również do analizy eksonów 2-10 i 12-24 genu *BRCA1* oraz 2-9 i 12-27 genu *BRCA2* w grupie pacjentek, u których w wyniku analizy metodą PTT nie wykazano obecności mutacji w badanych fragmentach obu genów. Większość starterów, które wykorzystano do zamplifikowania badanych fragmentów, pochodziła z publikacji poświęconej analizie mutacji w genach *BRCA1/BRCA2* metodą DHPLC (Wagner, 1999). Pozostałe startery zostały zaprojektowane w Katedrze Biologii i Genetyki GUMed w oparciu o sekwencje genów opublikowane w bazie Ensembl (<http://www.ensembl.org>; *BRCA1*: ENST00000337272; *BRCA2*: ENST00000267071). Optymalizację DHPLC wykonywano przy zastosowaniu oprogramowania dostarczonego przez producenta (Transgenomic NavigatorTM Software). Sekwencje starterów dla zamplifikowania sekwencji kodującej genów *BRCA1* i *BRCA2* oraz optymalne warunki rozdziału przedstawiono odpowiednio w tab. 13 i 14. Próbkki wykazujące odmienny profil pików na chromatogramie były ponownie amplifikowane i poddawane reakcji sekwencjonowania.

Tab. 13. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji oraz warunki rozdziału na DHPLC poszczególnych eksonów genu *BRCA1*

Ekson	Starter "FORWARD"	Starter "REVERSE"	Temp. przyłączania (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość / próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Temp. rozdziału WAVE (°C)
ex_2	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT	55	3	258	55
ex_3	GAAGTTATTCATAAGAATAGC	GCTTCTATAAAGTTAGGTGTTTC	57	3,5	224	55,6
ex_5	GTTGTGAGATTATCTTTTCATGGC	CTTCCAACCTAGCATCATTACCA	63-56/56	3,5	208	53,9
ex_6	GTCTTTTCTTATTTTAGTGTCC	TGAGTTTCATGGACAGCACT	58	3,5	218	56
ex_7	GCATACATAGGGTTTCTCTTGG	AGGACTGCTTCTAGCCTGGG	62	2,5	337	54
ex_8*	TGTTAGCTGACTGATGATGGT	ATCCAGCAATTATTATTAAATAC	54	2,5	267	56,4/58,7
ex_9	CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA	TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA	54	2,5	211	53/55
ex_10*	TGGTCAGCTTTCTGTAATCG	GTATCTACCCACTCTCTTCTTCAG	56	2,5	241	56,7
ex_11-1	TAGCCAGTTGGTTGATTTCC	CTCACACAGGGGATCAGCATTC	63-56/56	1,5	477	55
ex_11-2	CAACATAACAGATGGGCTGGAAG	ACGTCCAATACATCAGCTACTTTGG	66	2,5	296	56,8
ex_11-3*	GCAGCATTCAGAAAGTTAATGAG	GGCCTGATGTAGGTCTCCTTT	56	2,5	405	55,7
ex_11-4	AGGAGCATTTGTTACTGAG	AGACTTCCTCCTCAGCCTATT	52	2,5	389	54,5
ex_11-5	ATCCACAATTCAAAGCACC	TCTTCTTTTTCTTCTCTTGGA	58	2,5	392	56,6
ex_11-6	CTAAGTGTTCAAATACCAGT	ATTTCTATGCTTGTTTCCCG	52	2,5	411	55,2
ex_11-7	ATCCATTGGGACATGAAGTTA	CTTGATTTTCTTCTTTTGT	50	2,5	231	56,2
ex_11-8	GCCAGTCATTTGCTCCGTTTTTC	CGTTGCCTCTGAACTGAGATGATAG	55	2,5	288	56
ex_11-9	TGCAGGCTTTCCTGTGGTTG	GGCTAATTGTGCTCACTGTACTTGG	60	4	305	55
ex_11-10	TCAATGTCACCTGAAAGAGAAATGG	CAGGATGCTTACAATTACTTCCAGG	55	2	301	56
ex_11-11	TTGAATGCTATGCTTAGATTAGGGG	TTCTGAGGACTCTAATTTCTTGG	50-56/56	3,5	402	54,5/56,8
ex_11-12	GAGTCCTAGCCCTTTCACCCATAC	GTGATGTTCTGAGATGCCTTTG	63-56/56	1,5	289	56,5
ex_11-13	CTAAGAACACAGAGGAGAATTT	TCCCCAAAAGCATAAACATTT	63-56/56	3	363	56,6

* Fragmenty których amplifikacja wymagała użycia wyższego stężenia starterów (25μM) oraz wyższego stężenia dNTP (10mM).

Tab. 13. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji oraz warunki rozdziału na DHPLC poszczególnych eksonów genu *BRCA1* – cd.

Ekson	Starter "FORWARD"	Starter "REVERSE"	Temp. przyłączania (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość / próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Temp. rozdziału WAVE (°C)
ex_12	GTCCTGCCAATGAGAAGAAA	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	60	2,5	265	57,5/60
ex_13	TTTAATGGAAAGCTTCTCAAA	GATAAAGGGGAAGGAAAGAAT	58	1,5	289	56,5/59
ex_14	CTAACCTGAATTATCACTATCA	GTGTATAAATGCCTGTATGCA	54	2	312	53,7/54,7
ex_15	TGGCGATGGTTTTCTCCTTCC	TCCAATACAGCAGATGAAATA	50	1,5	251	56,5/58,5
ex_16	CAGAGACCAGAACTTTGTAAT	TAGTCATTAGGGAGATACATA	50	2,5	412	58,7
ex_17	TAACTCATGATAATGGAATAT	TCGCCTCATGTGGTTTTA	58	1,5	182	57
ex_18	GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC	GAGACCATTTTCCCAGCATC	60	1,5	352	54,5/56
ex_19	TTCTTCTGCTGTATGTAACCT	TGATGGAAGGAAGCAAATACA	55	1,5	163	54,5/55,7
ex_20	ATATGACGTGTCTGCTCCACC	AATGAAGCGGCCCATCTC	61	2	249	59
ex_21*	AAGCTCTTCCTTTTTGAAAGTC	GTAGAGAAATAGAATACCCTCT	55	2,5	298	53/58/59
ex_22	TCCCATTGAGAGGTCTTGCT	GAGAAGACTTCTGAGGCTAC	60	2,5	297	58/60
ex_23	AATGCTCTTTCCTTCTGG	ACTCAAGCACCAGGTAATG	62	1,5	168	57/61
ex_24	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	60	2,5	280	57/59

* Fragmenty których amplifikacja wymagała użycia wyższego stężenia starterów (25μM) oraz wyższego stężenia dNTP (10mM).

Tab. 14. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji oraz warunki rozdziału na DHPLC poszczególnych eksonów genu *BRCA2*.

Ekson	Starter "FORWARD"	Starter "REVERSE"	Temp. przyłączania (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość / próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Temp. rozdziału WAVE (°C)
ex_2*	TGTTCCCATCCTCACAGTAAG	GTACTGGGTTTTTAGCAAGCA	69-62	3,5	336	56,5
ex_3*	GGTTAAACTAAGGTGGGA	ATTTGCCCAGCATGACACA	56,5	2	390	55,2/56
ex_4*	TTCCCAGTATAGAGGAGAC	GTAGGAAAATGTTTCATTTAA	50	2,5	260	54
ex_5-6*	CCTAAGGGATTTGCTTTGTTTT	TCAGGGCAAAGGTATAACGC	69-62	2,5	286	54/54,7
ex_7*	GGCAATTCAGTAAACGTAA	ATTGTCAGTTACTAACACAC	54	2,5	356	52,5/57
ex_8*	GTGTCATGTAATCAAATAGT	CAGGTTTAGAGACTTTCTC	50	2,5	288	53,2
ex_9*	GTGAAACCATGGATAAGGGG	ACGGGTGACAGAGCAAGACT	59	2,5	287	54,5/56,5
ex_10-1	TATAAAATATTAATGTGCTTCTGTT	AAAGGGCTTCTGATTTGCTAC	63-56/56	2,5	374	52,5
ex_10-2	ATCTGAAGTGGAACCAAATGATAC	ACGTGGCAAAGAATTCTCTGAAGTAA	63-56/56	2,5	280	55
ex_10-3	TTTCAGAAAAAGACCTATTAGACA	CTTTTTGATACCCTGAAATGAAGAAG	63-56/56	2,5	242	54,4
ex_10-4*	CAGCATCTTGAATCTCATACAG	CTGGCCAGCTTCCATTATC	58	2,5	280	54,7
ex_10-5	TTTAATTGATAATGGAAGCTGG	TTACAAAAAAAAAAGACAGAGGT	63-56/56	2,5	268	54,2
ex_11-1*	TTTAGTGAATGTGATTGATGGT	CAAGATCCTGAGAGATTACTG	56	2,5	210	54
ex_11-2*	TAGCTCTTTTGGGACAATTC	ATAAAAGACTTTTCTGGGATTG	55	2,5	303	54,2
ex_11-3*	TGGAATACAGTGATACTGAC	ATACATCTTGATTCTTTCCAT	55	2,5	228	54,2
ex_11-4*	ATGGAAAAGAATCAAGATGTAT	GTCTCCATATAAACCATGGA	67-59	2,5	354	55,5
ex_11-5	CGAACCCATTTTCAAGAACTCTACCA	TGTAATCATTATTTTTTCTGG	63-56/56	2	215	53,3
ex_11-6	TTGGTTTATGTTCTTGAGAGGAG	CCTTTTGGCTAGGTGTAAATTATGG	63-56/56	2,5	487	53,3
ex_11-7*	GTCATATAACCCCTCAGATG	CTTGCTGCTGTCTACCTG	55	2,5	290	54,5

* Fragmenty których amplifikacja wymagała użycia wyższego stężenia starterów (25μM) oraz wyższego stężenia dNTP (10mM).

Tab. 14. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji oraz warunki rozdziału na DHPLC poszczególnych eksonów genu *BRCA2* –cd.

Ekson	Starter "FORWARD"	Starter "REVERSE"	Temp. przyłączenia (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość / próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Temp. rozdziału WAVE (°C)
ex_11-8*	CGATTGGTCAGGTAGACAGC	CCTCTGCAGAAGTTTCCTCAC	60	2,5	249	57,5
ex_11-9	GAAATTAAACGGAAGTTTGCTGG	TGAATCACTGCCATCAAATTCTAAG	63-56/56	2,5	465	52,1
ex_11-10	AATGACTACTGGCACTTTTGTTG	CACTTGCAGTCTGAAAAATGTATC	63-56/56	2,5	404	53
ex_11-11	TTGTCAGATTTAACTTTTTTGAAG	CAACTGGGACACTTTCTTTTCAG	63-56/56	2,5	343	53
ex_11-12*	GTGTCGCCAAAGAGTCATTT	AGTACCTTGCTCTTTTTTCATC	56	2,5	350	54,3
ex_11-13*	CAGCTAGCGGGAAAAAAGTTA	ACAAGGTTTTTATCATTATTG	50	2,5	238	55,7
ex_11-14	TGAGACCATTGAGATCACAGC	TAGTCACAAGTTCCTCAACGCA	63-56/56	2,5	707	52,5
ex_11-15	GCCAGTATTGAAGAATGTTGAAGATC	AAACCTTATGTGAATGCGTGCTAC	68-61/61	2,5	443	55,1
ex_11-16	AACGAAAATTATGGCAGGTTGTTAC	GCTTTCCACTTGCTGTACTAAATCC	68-61/61	2	436	54,2
ex_11-17	CCAGCTCACAAGAGAAGAAAATACTG	TTACGTTTTTAGGTGAAGCCTGTTC	68-61/61	2	503	53,5
ex_11-18	AAACCCAGAGCACTGTGTAACTC	TCTCCTCTTCTTTTTCCAATTCTTG	68-61/61	2	489	53,7/55,2
ex_11-19	GACAGATTCTAACTGCCAAGTCATG	TAACCATACTCCCCAACTGAC	68-61/61	2	267	55,3/56,4
ex_12*	ACTCTTTCAAACATTAGGTCA	CTATAGAGGGAGAACAGAT	54	2,5	292	52,5/53
ex_13	GCATCCGTTACATTCACTGAAA	ACGGGAAGTGTTAACTTCTTAACG	65-58/58	2	311	53/54
ex_14a	ACCATGTAGCAAATGAGGGTCT	GCTTTTGTCTGTTTTCTCCAA	63-56/56	2,5	448	53/56
ex_14b	CACAGAGTTGAACAGTGTGTTAGG	GGGCTTTAAAATTACCACCACC	68-61/61	1,5	297	55/56

* Fragmenty których amplifikacja wymagała użycia wyższego stężenia starterów (25μM) oraz wyższego stężenia dNTP (10mM).

Tab. 14. Sekwencje starterów, warunki amplifikacji oraz warunki rozdziału na DHPLC poszczególnych eksonów genu *BRCA2* –cd.

Ekson	Starter "FORWARD"	Starter "REVERSE"	Temp. przyłączenia (°C)	MgCl ₂ [25mM] objętość / próbkę [μl]	Długość produktu (pz)	Temp. rozdziału WAVE (°C)
ex_15	GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT	ATTCATTCATCCATTCCTGC	63-56/56	2,5	369	53/54
ex_16*	TTTTTGTGTGTGTTTATTTTGTGTAG	GAAGAAAGAGGGATGAGGGAA	68-61/61	2,5	290	55,2
ex_17*	CAGAGAATAGTTGTAGTTGTT	AACCTTAACCCATACTGCC	56,5	2	302	53
ex_18a*	AATTCTAGAGTCACACTTCC	ATCTAACTGGGCCTTAACAGC	55	2,5	273	54
ex_18b*	GCTGTTAAGGCCAGTTAGAT	GAAATTGAGCATCCTTAGTAA	69-62	2,5	255	53,5/55,5
ex_19	CTTATTTACTGTCTTACTAATCTTCCT	GACCGAAACTCCATCTCAAAC	63-56/56	2,5	389	52/54,5
ex_20*	CACTGTGCCTGGCCTGATAC	ATGTTAAATTCAAAGTCTCTA	53	2,5	296	55
ex_21*	CTTTTAGCAGTTATATAGTTTC	GCCAGAGAGTCTAAAACAG	54	2,5	322	54,3
ex_22	AACCACACCCTTAAGATGAGC	GGGCATTAGTAGTGGATTTTGC	63-56/56	2,5	455	52,5
ex_23	ACTTCTTCCATTGCATCTTTCTCA	AAAACAAAACAAAATTCAACATA	66-59/59	2,5	290	54,8
ex_24*	CAGTTTTGATAAGTGCTTGTT	AGCTCCAATAATCATAAGA	52	2,5	290	54,2/57,5
ex_25	GCTTTCGCCAAATTCAGCTA	TACCAAAATGTGTGGTGATGC	65-58/58	2	427	52,5/55,5/56,8
ex_26	GTCCCAAACCTTTTCATTTCTGC	GGAGCCACATAACAACCACA	63-56/56	2,5	378	53,8
ex_27a	CATTTTTTTATCAGATGTCTTCTCC	TGTTTTTCTCCTGTTGAACCAG	63-56/56	2,5	457	55
ex_27b	GAATTCTCCTCAGATGACTCCA	TCTTTGCTCATTGTGCAACA	63-56/56	2,5	415	53,5/57

* Fragmenty których amplifikacja wymagała użycia wyższego stężenia starterów (25μM) oraz wyższego stężenia dNTP (10mM).

5.2.5.1. Amplifikacja fragmentów DNA.

Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 25 μ l. Każdorazowo w reakcji PCR stosowano kontrolę negatywną, gdzie do próbki zamiast DNA dodawano identyczną objętość wody destylowanej. W przypadku fragmentów dla których posiadano DNA ze zidentyfikowaną wcześniej zmianą w sekwencji genu (zarówno mutacją, jak i polimorfizmem), stosowano również kontrole pozytywne, które w trakcie rozdziału chromatograficznego dawały odmienny wzór pików.

Skład mieszaniny reakcyjnej ustalano w oparciu o wartość stężenia jonów magnezu (tab. 13 i 14) konieczną do powielenia badanego fragmentu genu. Zależności pomiędzy objętością $MgCl_2$ a objętościami pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tab.15. Fragmenty, dla których amplifikacja wymagała użycia wyższego stężenia starterów i dNTP, oznaczono w tab. 13 i 14 gwiazdką. Składniki mieszaniny PCR zamieszczono w tab. 16. Dla każdego amplifikowanego fragmentu reakcja PCR składała się z 35 cykli.

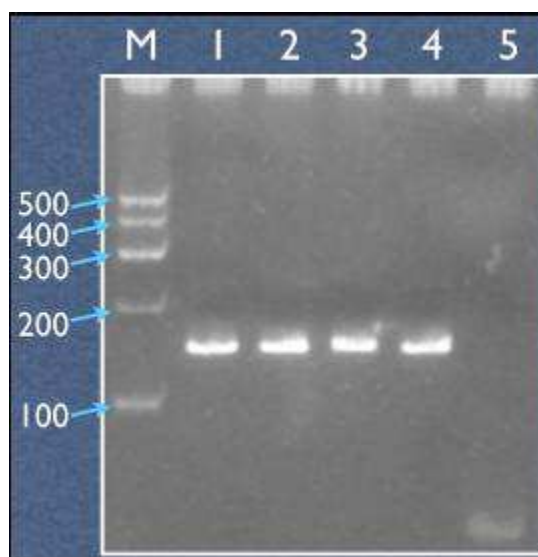
Tab. 15. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów *BRCA1* i *BRCA2* w zależności od stężenia jonów magnezu.

Składnik mieszaniny:	Objętość/próbkę [μ l]					
Woda	19,4	18,9	18,4	17,7	17,2	16,4
10xPCR bufor	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
$MgCl_2$ [25mM]	1,5	2	2,5	3	3,5	4
dNTP mix [10 mM]	0,5	0,5	0,5	1	1	1
Mieszanina starterów [10 μ M]	0,5/0,5	0,5/0,5	0,5/0,5	0,5/0,5	0,5/0,5	0,5/0,5
Polimeraza Taq [5U/ μ l]	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
DNA [30 ng/ μ l]	1	1	1	1	1	1

Tab. 16. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów *BRCA1* i *BRCA2* wymagających użycia wyższego stężenia starterów i dNTP.

Składnik mieszaniny:	objętość/próbkę [μl]
Woda	17,0
10xPCR bufor	2,5
MgCl ₂ [25mM]	2,5
dNTP mix [10 mM]	1
Mieszanina starterów [25μM]	2
Polimeraza Taq [5U/μl]	0,15
DNA [30 ng/μl]	1

Optymalną temperaturę amplifikacji badanych fragmentów podano w tab. 13 i 14. Po reakcji PCR produkt rozdzielano na 7% żelu poliakrylamidowym w celu potwierdzenia obecności zamplifikowanego fragmentu, jak również sprawdzenia specyficzności przeprowadzonej reakcji PCR (Ryc. 9).



Ryc. 9. Przykładowy żel poliakrylamidowy wybarwiony bromkiem etydyny.

Na żelu uwidoczniono zamplifikowany fragment eksonu 19 genu *BRCA1*.

M-marker wielkości (wartości wyrażone w pz); 1, 2, 3, 4 - zamplifikowane fragmenty genu, piąta próbka - kontrola negatywna.

5.2.6. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Technika MLPA została wykorzystana do analizy dużych rearanżacji we wszystkich eksonach genów *BRCA1* i *BRCA2* w grupie 43 pacjentek z rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, u których w obu genach nie wykryto mutacji punktowych. Analizę MLPA wykonano z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów SALSA P002, P0087 (gen *BRCA1*) i P045 (gen *BRCA2*) (MRC Holland) a protokół postępowania był zgodny z zaleceniami producenta zamieszczonymi w materiałach informacyjnych o produkcie.

5.2.6.1. Analiza wyników MLPA

W celu wykonania analizy, wartości powierzchni pików (ang. *peak area*) otrzymanych dla poszczególnych eksonów badanych genów, przenoszono do arkusza kalkulacyjnego Excel dostępnego na stronie National Genetics Reference Laboratory (<http://www.ngrl.org.uk/Manchester/mlpapubs.html>). Wyniki każdej próbki były porównywane do wartości uzyskanych dla kontroli negatywnych, które stanowiły próbki pochodzące od pacjentek, u których wykluczono występowanie dużych rearanżacji, jak również innych zmian w sekwencji mogących zaburzać proces ligacji sond do matrycy. Zgodnie z zaleceniami producenta przyjęto, że wynik RPA w granicach 50 -75% świadczy o delecji, natomiast RPA od 135 – 150% wskazuje na amplifikację badanego fragmentu genu.

5.2.7. Sekwencjonowanie wybranych produktów PCR

Reakcji sekwencjonowania poddawano próbki, które w trakcie analizy metodami pośrednimi, takimi jak PTT czy DHPLC, wykazywały odmienny wzór mogący świadczyć o obecności mutacji. Próbki takie ponownie amplifikowano, a następnie produkt reakcji PCR oczyszczano przy użyciu zestawu *Clean-up* (A&A Biotechnology). Protokół postępowania był zgodny z zaleceniami producenta zamieszczonymi w materiałach informacyjnych o produkcie. Każdy z produktów był poddawany reakcji sekwencjonowania przy użyciu zarówno startera sensownego (ang. *forward*) jak i antysensownego (ang. *reverse*), co miało ograniczyć występowanie ewentualnych wyników fałszywie negatywnych i pozytywnych. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania przedstawiono w tab. 17.

Tab. 17. Skład mieszaniny reakcyjnej do sekwencjonowania

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

Reakcję amplifikacji prowadzono zgodnie z zaleceniami firmy ABI Biosystems – warunki znajdują się w tab. 18.

Tab. 18. Warunki amplifikacji produktu do sekwencjonowania

Etap	Temp.	Czas (min)	Liczba cykli
wstępna denaturacja	95°C	2,00	-
denaturacja	95°C	0,10	25 cykli
przyłączanie starterów	50°C	0,05	
wydłużanie	60°C	4,00	

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 temp. 95°C przez trzy min. i natychmiast schładzano do 4°C. Następnie próbki analizowano w sekwenatorze automatycznym ABI PRISM 310 (Applied Biosystems Inc)

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. 4.7 (demo).

5.2.8. Wariant sekwencyjny: IVS14+1G>A (c.4484+1G>A)

W celu określenia potencjalnego efektu patogennego polegającego na nieprawidłowym procesie składania mRNA, a w konsekwencji utracie całego eksonu 14, wykonano analizę cDNA.

Do amplifikacji badanego fragmentu genu użyto następujących starterów: starter sensowny zlokalizowany w obrębie eksonu 11 (c.3986 - c.4003): 5'-AAAGCCAGGGAGTTGGTC-3' i starter antysensowny znajdujący się w eksonie 15 (c.4520 - c.4539): 5'-GCAACTGTGCATGTACCACC- 3'. Skład mieszaniny i warunki reakcji PCR przedstawiono poniżej (Tab. 19 i 20).

Tab. 19. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu *BRCA1* (ekson11-15)

Składnik mieszaniny:	Objętość/próbkę [μl]
Woda	69,5
10xPCR bufor	10
MgCl ₂ [25mM]	12
dNTP mix [10 mM]	4
Mieszanina starterów [10μM]	2
Polimeraza Taq [5U/μl]	0,5
cDNA [ng/μl]	2

Tab. 20. Warunki amplifikacji fragmentu genu *BRCA1* obejmującego eksony 11-15

Etap	Temp.	Czas (min)	Liczba cykli
wstępna denaturacja	94°C	7,00	-
denaturacja	94°C	0,30	40 cykli
przyłączanie starterów	°C	0,30	
wydłużanie	72°C	1,30	
końcowe wydłużanie	72°C	7,00	-

Uwidocznione w wyniku rozdziálu elektroforetycznego produkty (prawidłowy o długości ~ 550pz i z delecją ~ 320pz) wycinano z żelu, czyszczono przy pomocy zestawu *Gel Out* (A&A Biotechnology) i sekwencjonowano.

5.2.9. Częstość występowania wariantu sekwencyjnego 10323delCins11 (c.10095delCins11) w grupie kontrolnej.

Ponieważ materiał do tej części badań stanowiły wysuszone na bibule plamy krwi, w celu szybkiej i wydajnej amplifikacji badanego fragmentu genu (ekson 27 *BRCA2*), bez konieczności izolacji DNA, zastosowano reakcję *nested* PCR. Szczegółowy protokół postępowania przedstawiono poniżej (Tab. 21)

Tab. 21. Analiza wariantu sekwencyjnego c.10095delCins11 w grupie kontrolnej.

1. Do cienkościennej probówki PCR włożyć fragment bibuły (~ 2mm), dodać 25 µl wody, a następnie inkubować w temp. 94°C przez 60 min.
2. Następnie dodać po 19µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej wg poniższego schematu:

Składnik mieszaniny:	objętość/próbkę [µl]
Woda	97
10xPCR bufor	3,5
MgCl ₂ [25mM]	3,5
dNTP mix [10 mM]	0,7
Mieszanina starterów [10µM] ¹⁾	1,4
Polimeraza Taq [5U/µl]	0,2

¹⁾ Sekwencje starterów zastosowanych do amplifikacji fragmentu 27b genu *BRCA2*, podano w tab. 14

3. Przeprowadzić reakcję PCR w warunkach podanych poniżej:

Etap	Temp.	Czas (min)	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	94°C	7,00	-
denaturacja	94°C	0,30	20 cykli
przyłączanie starterów	56°C	0,30	
wydłużanie	72°C	0,30	
końcowe wydłużanie	72°C	7,00	-

4. W celu oddzielenia bibuły od produktu reakcji PCR, próbki wirować przez 15-20 min. (1500 x g, 4°C).

5. Do nowych probówek PCR przenieść po 2µl produktu pierwszej reakcji PCR, a następnie dodać po 33µl zamieszczonej poniżej mieszaniny reakcyjnej:

Składnik mieszaniny	objętość /próbkę [µl]
Woda	26,8
10xPCR bufor	3,5
MgCl ₂ [25mM]	0,75
dNTP mix [10mM]	0,75
Mieszanina starterów [10µM] ²⁾	1
Polimeraza Taq [5U/µl]	0,2

²⁾ W celu amplifikacji krótkiego fragmentu eksonu 27 zastosowano startery wewnętrzne o następującej sekwencji: **27b_F/n**: CCCAAGCTCTTTTGTCTGGT; **27b_R/n**: GCCTGGGAAGCTCTCCTGTTC

6. Przeprowadzić reakcję PCR wg następującego schematu:

Etap	Temp.	Czas (min)	Liczba cykli
wstępna denaturacja	94°C	7,00	-
denaturacja	94°C	0,30	40 cykli
przyłączanie starterów	58°C	0,30	
wydłużanie	72°C	0,30	
końcowe wydłużanie	72°C	7,00	-

7. Po sprawdzeniu poprawności amplifikacji (elektroforeza na 2% żelu agarozowym) przeprowadzić analizę DHPLC.

5.2.10. Nazewnictwo mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*.

W przypadku genów *BRCA1* i *BRCA2* stosowane są dwie formy numeracji sekwencji genu i nazewnictwa mutacji. Pierwszy z nich, nadal szeroko stosowany, wykorzystuje numerację transkryptu *BRCA1* - U14680, a dla *BRCA2* - U43746. W tym przypadku numeracja sekwencji genu ma początek w niekodującym eksonie pierwszym. I tak dla *BRCA1* jest to 120 par zasad przed kodonem kodującym pierwszą metioninę, a dla *BRCA2* wartość ta wynosi 229 par zasad.

Zgodnie z nowymi zasadami zapisu (<http://www.hgvs.org/mutnomen>), w celu ujednolicenia nazewnictwa mutacji, jako pozycję +1 uznaje się pierwszą adeninę (A) w kodonie start (ATG). Ta forma zapisu jest wciąż mało popularna wśród naukowców zajmujących się badaniem genów *BRCA1* i *BRCA2*. W niniejszej pracy zarówno w tekście jak i tabelach (tab. 22, tab. 23) zastosowano obydwie formy zapisu mutacji. Podobnie nowa i stara forma numeracji obu genów została uwzględniona na schematach obu genów, które umieszczono w rozdziale 10 (Załączniki).

5.2.11. Metody statystyczne.

Wyniki badań molekularnych oraz dane kliniczne poddano analizie statystycznej. Analiza rozkładu otrzymanych wyników została przeprowadzona za pomocą testów chi-kwadrat: Pearsona, z poprawką Yatesa oraz dwustronnego Fishera. Natomiast wpływ obecności mutacji na wybrane parametry kliniczne (wiek zachorowania) badano z użyciem test U Manna i Whitneya. Obliczeń dokonano z zastosowaniem oprogramowania *STATISTICA for Windows 7.1* firmy StatSoft (Dobosz M., 2004).

6. WYNIKI

6.1. Wyniki analizy sekwencji genów *BRCA1* i *BRCA2*

Analiza molekularna genów *BRCA1* i *BRCA2* została przeprowadzona w grupie 155 pacjentek z silną rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika. Dokładna charakterystyka grupy badanej oraz kryteria na podstawie których kwalifikowano pacjentki do badania przedstawiono w rozdz. 5.1.1 i 5.1.2.

W pierwszym etapie prowadzonych badań, wszystkie eksony kodujące wraz z przylegającymi fragmentami intronów genów *BRCA1* i *BRCA2*, zostały zamplifikowane, a następnie poddane analizie mutacji za pomocą technik DHPLC i/lub PTT.

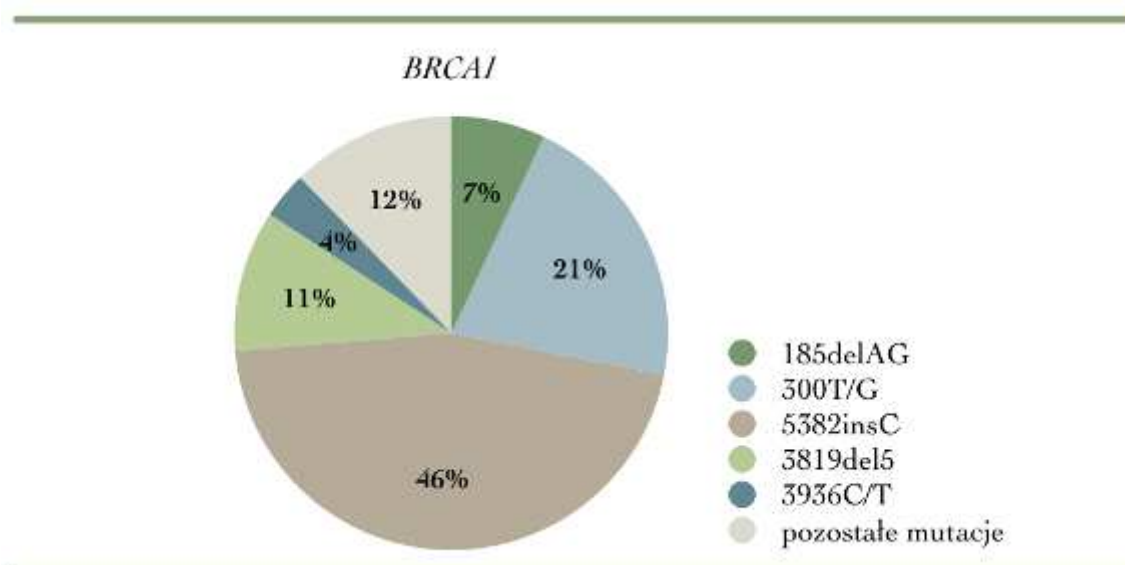
Kolejnym etapem badań było wykonanie analizy w kierunku obecności dużych rearanżacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* z zastosowaniem techniki MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Badanie to przeprowadzono w grupie 43 pacjentek u których wykluczono występowanie mutacji punktowej w obu genach. Próbkę w której dla jednego lub kilku eksonów RPA (*Relative Peak Area*) miał wartość $\geq 75\%$ lub $\leq 135\%$ RPA w badaniu kontrolnym uważano za potencjalnie nieprawidłowe. W celu potwierdzenia występowania zmiany wykonywano drugą niezależną reakcję MLPA.

W badanej grupie wykazano obecność 64 ($n=64/155$; 41.3%) mutacji punktowych oraz dwóch dużych delecji. Spośród wykrytych mutacji punktowych 57 (89%) znajdowało się w genie *BRCA1*, a 7 (11%) w *BRCA2*. Dwukrotnie wykryto występowanie wariantu sekwencyjnego 10323delCins11 (c.10095delCins11) zlokalizowanego w eksonie 27 genu *BRCA2*.

W genie *BRCA1* najczęstsze były dwie mutacje założycielskie: 5382insC (c.5266dupC) w eksonie 20 oraz 300T>G (c.181T>G) w eksonie 5. Stanowiły one odpowiednio 46% ($n=26/57$) i 21% ($n=12/57$) wszystkich mutacji. Inne powtarzające się mutacje to: 3819del5 (c.3700_3704del5), 3936C>T (c.3817C>T) w eksonie 11, stanowiące odpowiednio 11% ($n=6/57$) i 4% ($n=2/57$) oraz 185delAG (c.68_69delAG) w eksonie 2 ($n=4/57$; 7%). Dodatkowo znaleziono pojedyncze przypadki innych mutacji punktowych (1629delC (c.1510delC), 2682C>T (c.2563C>T), 2991del5 (c.2872_2876del5), 3726C>T

(c.3607C>T), ivs14+1G>A (c.4484+1G>A), 5370C>T (c.5251C>T), 5465G>A (c.5346G>A)), które stanowiły łącznie 12% wszystkich mutacji genu *BRCA1* (Wykres 2).

Ponadto w wyniku analizy MLPA (wielokrotna ligacja – zależna od amplifikacji fragmentów) zidentyfikowano dwie duże rearanżacje: delecję eksonów od 1 do 2, oraz delecję eksonów od 17 do 19 (n=2/43, 5%).



Wykres 2. Częstość występowania mutacji zidentyfikowanych w genie *BRCA1*

Mutacje zidentyfikowane w genie *BRCA2*, poza wariantem zlokalizowanym na końcu genu: 10323delCins11 (c.10095delCins11), nie powtórzyły się. Dokładny opis mutacji, z uwzględnieniem starego i nowego nazewnictwa, zamieszczono w tab. 22.

Tab. 22. Mutacje *BRCA1* i *BRCA2* w grupie 156 pacjentek z silną rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

Tab. 122. Mutacje BRCA1 i BRCA2 w grupie 100 pacjentów z silną rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i jajnika.

Lp.	Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane		Nazewnictwo wg HGV (http://www.hgvs.org/mutnomen)		Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Wiek probantki ^c	Klasyfikacja rodziny	Numer badania
		Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Zmiana nukleotydowa jako pozycję +1 uznaje się pierwszą adeninę (A) w kodonie start (ATG).	Zmiana aminokwasowa					
BRCA1										
1	2	185delAG	ter 39	c.68_69delAG	p.E23fsX18	F	Założycielska	BC (55)	BC	brca_1
2	2	185delAG	ter 39	c.68_69delAG	p.E23fsX18	F	Założycielska	BC (51) OC (51)	BC/OC	663
3	2	185delAG	ter 39	c.68_69delAG	p.E23fsX18	F	Założycielska	OC (52)	BC/OC	779
4	2	185delAG	ter 39	c.68_69delAG	p.E23fsX18	F	Założycielska	BC (43) OC (50)	BC/OC	681/1067
5	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (43)	BC	brca_14
6	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	OC (41)	BC/OC	brca_49
7	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (46)	BC	brca_54
8	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (32)	BC/OC	671
9	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	OC (43)	BC/OC	696
10	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	OC (37) BC (44)	BC/OC	906
11	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (43) OC (55)	BC/OC	1017
12	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (39)	BC	1058
13	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	OC (54)	BC/OC	1145
14	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (48)	BC	1267
15	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (38) BC (43) OC (47)	BC/OC	1280
16	5	300T>G	C61G	c.181T>G	p.C61G	M	Założycielska	BC (52)	BC/OC	1764
17	11	1629delC	ter 531	c.1510delC	p.R504fsX28	F	BIC(2) ^b	BC (40) BC (43)	BC	838
18	11	2682C>T	Q855X	c.2563C>T	p.Q855X	N	BIC(4) ^b	BC (27)	BC	brca_6
19	11	2991del5	ter 969	c.2872_2876del5	p.F958_R959delinsRfsX12	F	Dotychczas nie opisana	BC (37) OC (43)	BC/OC	1064

^{a)} F: mutacja powodująca zmianę ramki odczytu (z ang. *frameshift*); M: mutacja powodująca zmianę aminokwasową (z ang. *missense*); N: mutacja powodująca powstanie kodonu "STOP" (z ang. *nonsense*); S: mutacja powodująca powstanie błędu w procesie składania mRNA (z ang. *splice*) ^{b)} Ilukrotnie mutację odnotowana w bazie BIC ^{c)} BC – rak piersi; CC – rak jelita; OC – rak jajnika; UA – zdrowa; ^{d)} nieznane miejsca pęknięć, wynik potwierdzony z zastosowaniem SALSA P087

Tab. 22. Mutacje *BRCA1* i *BRCA2* w grupie 156 pacjentek z silną rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

Lp.	Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane		Nazewnictwo wg HGV (http://www.hgvs.org/mutnomen)		Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Wiek probantki ^c	Klasyfikacja rodziny	Numer badania
		Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Zmiana nukleotydowa jako pozycję +1 uznaje się pierwszą adeninę (A) w kodonie start (ATG).	Zmiana aminokwasowa					
BRCA1										
22	11	3726C>T	R1203X	c.3607C>T	p.R1203X	N	Powtarzająca się	UA	BC/OC	1904
21	11	3819del5	ter 1242	c.3700_3704del5	p.V1234_N1235delinsQfsX9	F	Powtarzająca się	OC (47)	OC	brca_12
22	11	3819del5	ter 1242	c.3700_3704del5	p.V1234_N1235delinsQfsX9	F	Powtarzająca się	UA	BC	705
23	11	3819del5	ter 1242	c.3700_3704del5	p.V1234_N1235delinsQfsX9	F	Powtarzająca się	UA	BC/OC	1150
24	11	3819del5	ter 1242	c.3700_3704del5	p.V1234_N1235delinsQfsX9	F	Powtarzająca się	UA	BC	1262
25	11	3819del5	ter 1242	c.3700_3704del5	p.V1234_N1235delinsQfsX9	F	Powtarzająca się	OC (47)	BC/OC	1763
26	11	3819del5	ter 1242	c.3700_3704del5	p.V1234_N1235delinsQfsX9	F	Powtarzająca się	BC (44)	BC	PLG20
27	11	3936C>T	Q1273X	c.3817C>T	p.Q1273X	N	BIC (2) ^b	UA	BC	brca_26
28	11	3936C>T	Q1273X	c.3817C>T	p.Q1273X	N	BIC (2) ^b	BC (38)	BC/OC	841
29	14	IVS14+1G>A	ter 1462	c.4484+1G>A	p.A1453_R1495delinsRfsX10	S	Dotychczas nie opisana	OC (61)	BC/OC	brca_3
30	20	5370C>T	R1751X	c.5251C>T	p.R1751X	N	Powtarzająca się	UA	BC/OC	1871/1923
31	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (28)	BC/OC	brca_10
32	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (50)	BC/OC	brca_19
33	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	UA	OC	brca_22
34	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (51)	OC	brca_39
35	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (37) OC (44)	BC/OC	brca_43
36	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (40)	BC/OC	brca_46
37	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (58)	BC/OC	718
38	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (53) OC (53)	BC/OC	723
39	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (48)	OC	PLG2/734
40	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (43)	BC	819

Znaczenie zastosowanych skrótów i symboli zamieszczono pod pierwszą częścią tab. 22

Tab. 22. Mutacje *BRCA1* i *BRCA2* w grupie 156 pacjentek z silną rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

Lp.	Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane		Nazewnictwo wg HGV (http://www.hgvs.org/mutnomen)		Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Wiek probantki ^c	Klasyfikacja rodziny	Numer badania
		Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Zmiana nukleotydowa jako pozycję +1 uznaje się pierwszą adeninę (A) w kodonie start (ATG).	Zmiana aminokwasowa					
BRCA1										
41	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (48)	BC	839
42	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (48)	BC/OC	861
43	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (47)	OC	876
44	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (44)	BC/OC	908
45	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (50) OC (51)	BC/OC	910
46	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (49) OC (46)	BC/OC	949
47	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	OC (44)	BC/OC	973
48	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (40)	BC	990
49	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (47) BC (66)	BC	1004
50	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (45)	BC	1131
51	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (26)	BC	1154
52	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (33)	BC/OC	1197
53	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (46) BC (53)	BC/OC	1233
54	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	UA	BC	1250
55	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	BC (33)	BC	1306
56	20	5382insC	ter 1829	c.5266dupC	p.Q1756fsX74	F	Założycielska	UA	BC/OC	1637
57	22	5465G>A	W1782X	c.5346G>A	p.W1782X	N	Powtarzająca się	OC (63)	OC	brca_9
BRCA2										
58	10	1529del4	ter 459	c.1301_1304del4	p.K434_R435delinsKfsX25	F	Powtarzająca się	BC (50)	BC	1223
35	10	1538del4	ter 459	c.1310_1313del4	p.K437_R438delinsIfsX22	F	Powtarzająca się	BC (66)	BC	1133

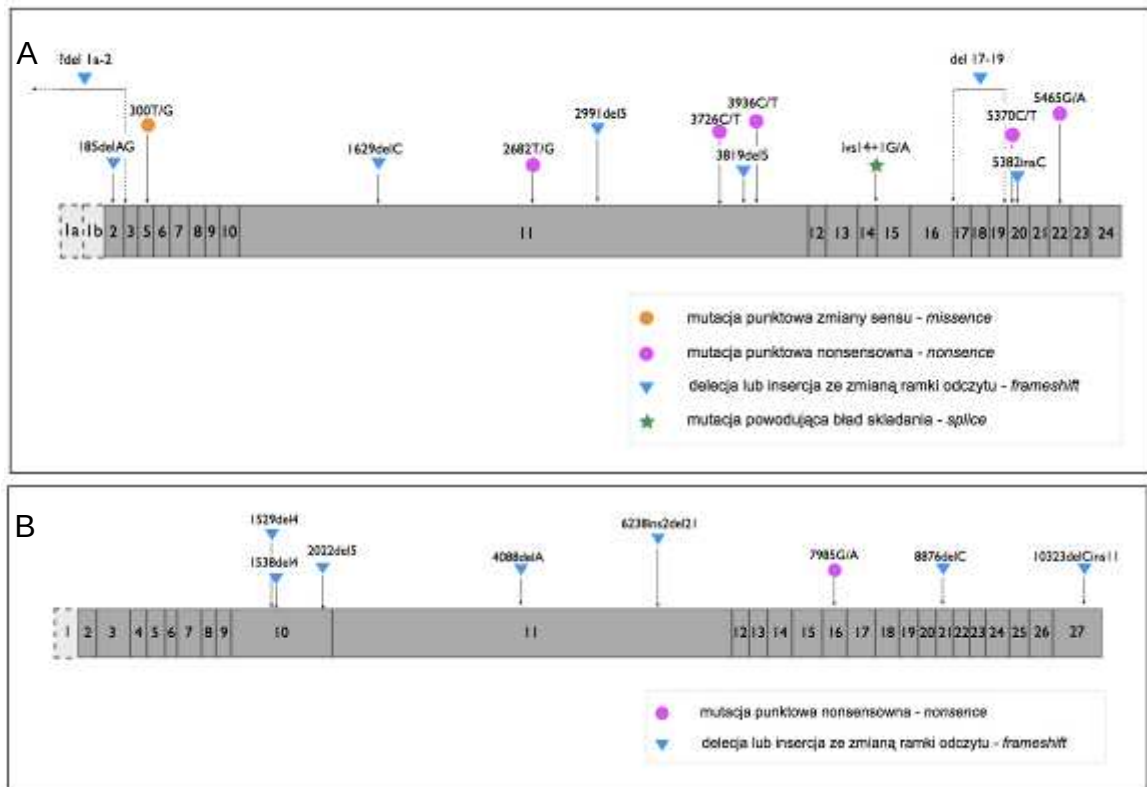
Znaczenie zastosowanych skrótów i symboli zamieszczono pod pierwszą częścią tab. 22

Tab. 22. Mutacje *BRCA1* i *BRCA2* w grupie 156 pacjentek z silną rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

Lp.	Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane		Nazewnictwo wg HGV (http://www.hgvs.org/mutnomen)		Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Wiek probantki ^c	Klasyfikacja rodziny	Numer badania
		Zmiana nukleotydowa	Zmiana aminokwasowa	Zmiana nukleotydowa jako pozycję +1 uznaje się pierwszą adeninę (A) w kodonie start (ATG).	Zmiana aminokwasowa					
BRCA2										
60	10	2022del5	ter 599	c.1794_1798del5	p.T598_Y600delinsTfs1	F	BIC(1) ^b	BC (45) BC (45)	BC/OV	1724
61	11	4088delA	ter 1291	c.3860delA	p.N1286fsX5	F	BIC(2) ^b	BC (37)	BC	brca_62
62	11	6238ins2del21	ter 2033	c.6010_6030delinsTT	p.E2004_V2010del insfsX36	F	Dotychczas nie opisana	BC (42)	BC	703
63	16	7985G>A	W2586X	c.7758G>A	p.W2586X	N	BIC(4) ^b	BC (48)	BC	brca_40
64	21	8876delC	ter 2890	c.8648delC	p.P2883fsX8	F	Dotychczas nie opisana	BC (40)	BC/OC	832
65	27	10323delCins11	ter 3369	c.10095delCins11	p.V3365fsX5	UV	Powtarzająca się	OC (54)	BC/OC	21
66	27	10323delCins11	ter 3369	c.10095delCins11	p.V3365fsX5	UV	Powtarzająca się	OC (51)	BC/OC	907
DUŻE REARANŻACJE										
67	1A, 1B, 2	del1A-2 ^{d)}		c.-184-?_80+?del	p.0?	F	Dotychczas nie opisana?	BC (39)	BC	Si-18
68	17, 18, 19	del17-19 ^{d)}		c.4987-?_5193+?del	p.M1663_E1731del	F	Dotychczas nie opisana?	BC (33) BC (41) CC (50)	BC	1006

Znaczenie zastosowanych skrótów i symboli zamieszczono pod pierwszą częścią tab. 22

Analiza molekularna genów *BRCA1* i *BRCA2* wykazała obecność 22 różnych mutacji: były to zarówno mutacje powodujące zmianę ramki odczytu (n=13/22; 59%), zamianę aminokwasową (n=1/22; 5%), powstanie kodonu STOP (n=6/22; 27%), defekt składania mRNA (n=1/22; 5%) czy też powodujące utratę kodonu start (ATG) (n=1/22; 5%) (Ryc. 10).



Ryc. 10. Spektrum mutacji zidentyfikowanych w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

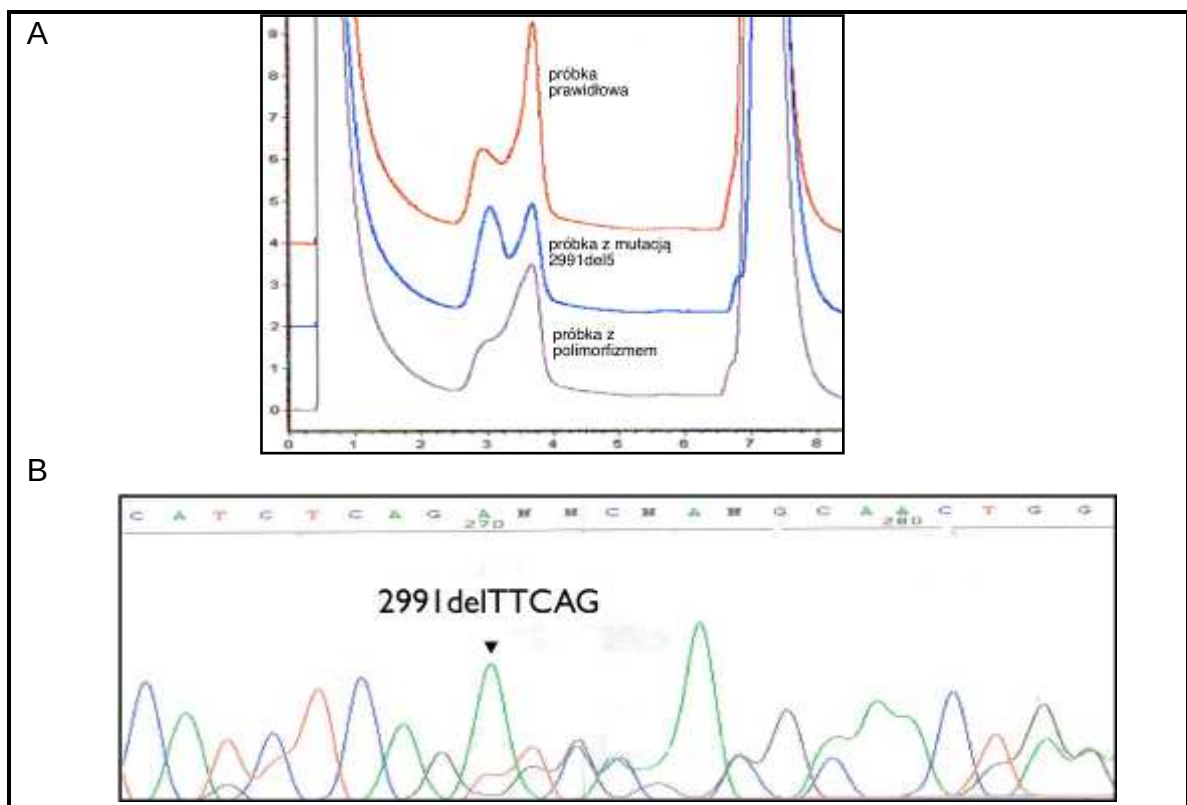
A) spektrum mutacji wykrytych w genie *BRCA1*, **B)** spektrum mutacji wykrytych w genie *BRCA2*

We wspomnianej grupie znajdują się trzy mutacje uważane za założycielskie (185delAG (c.68_69delAG), 300T>G (c.181T>G), 5382insC (c.5266dupC)) oraz siedem mutacji powtarzających się, zostały one odnotowane w bazie BIC od sześciu do 60 razy (*BRCA1*: 3726C>T (c.3607C>T), 3819del5 (c.3700_3704del5), 5370C>T (c.5251C>T), 5465G>A (c.5346G>A); *BRCA2*: 1529del4, 1538del4, 10323delCins11 (c.10095delCins11)).

Ponadto trzy mutacje zidentyfikowane w genie *BRCA1* (1629delC (c.1510delC), 2682C>T (c.2563C>T), 3936C>T (c.3817C>T)) i trzy w *BRCA2* (2022del5 (c.1794_1798del5), 4088delA (c.3860delA), 7885G>A (c.7758G>A)) zostały opisane w pojedynczych rodzinach (odnotowane w bazie BIC: od jednego do czterech razy), a kolejne cztery mutacje, w czasie ich identyfikacji, nie były

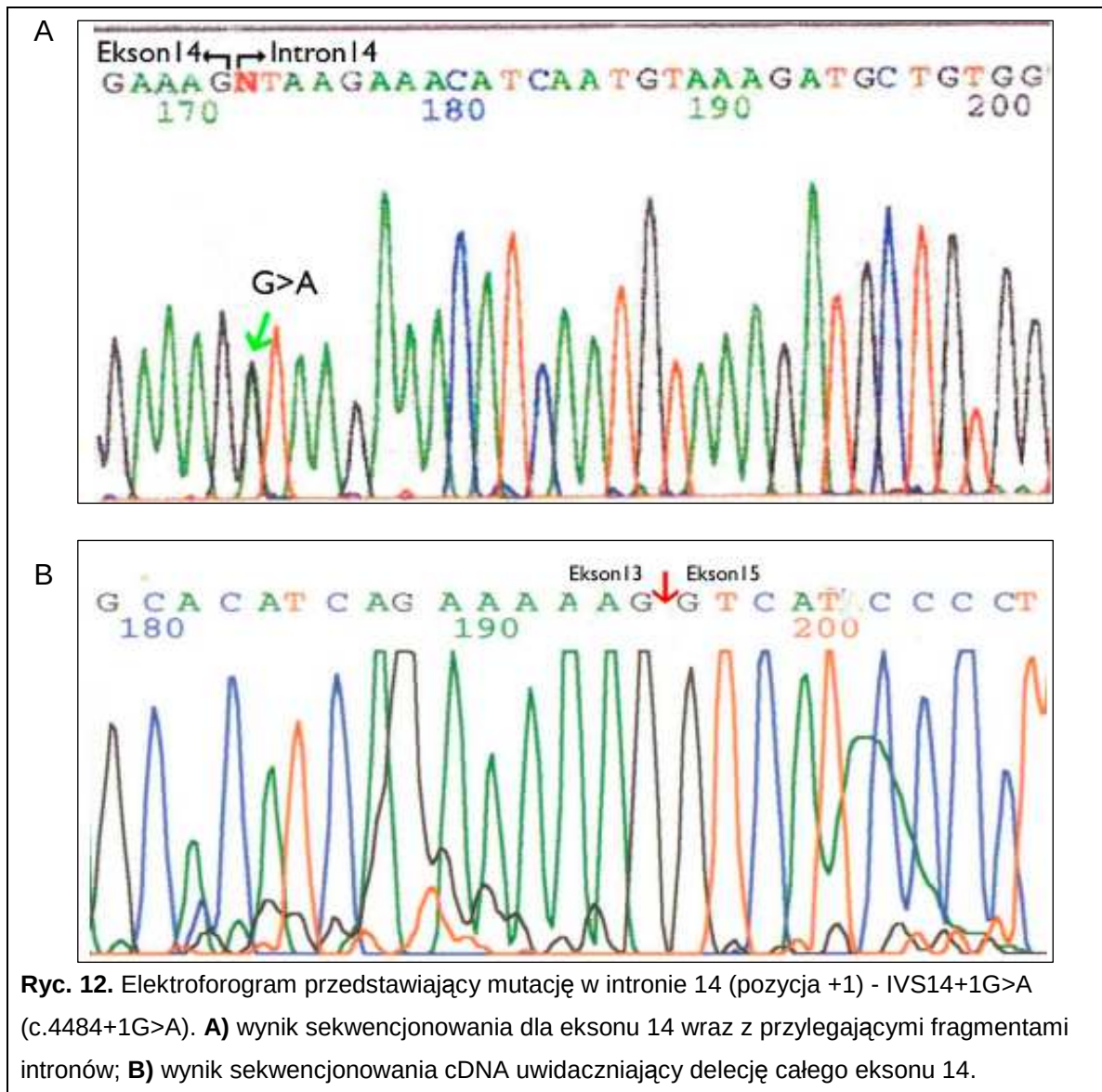
wcześniej opisane (BRCA1: 2991del5 (c.2872_2876del5), ivs14+1G>A (c.4484+1G>A); BRCA2: 6238ins2del21 (c.6010_6030delinsTT), 8876delC (c.8648delC)).

Poniżej przedstawiono przykładowe chromato- i elektroforogramy wraz z krótkim opisem rodzin w których mutacje zostały zidentyfikowane.

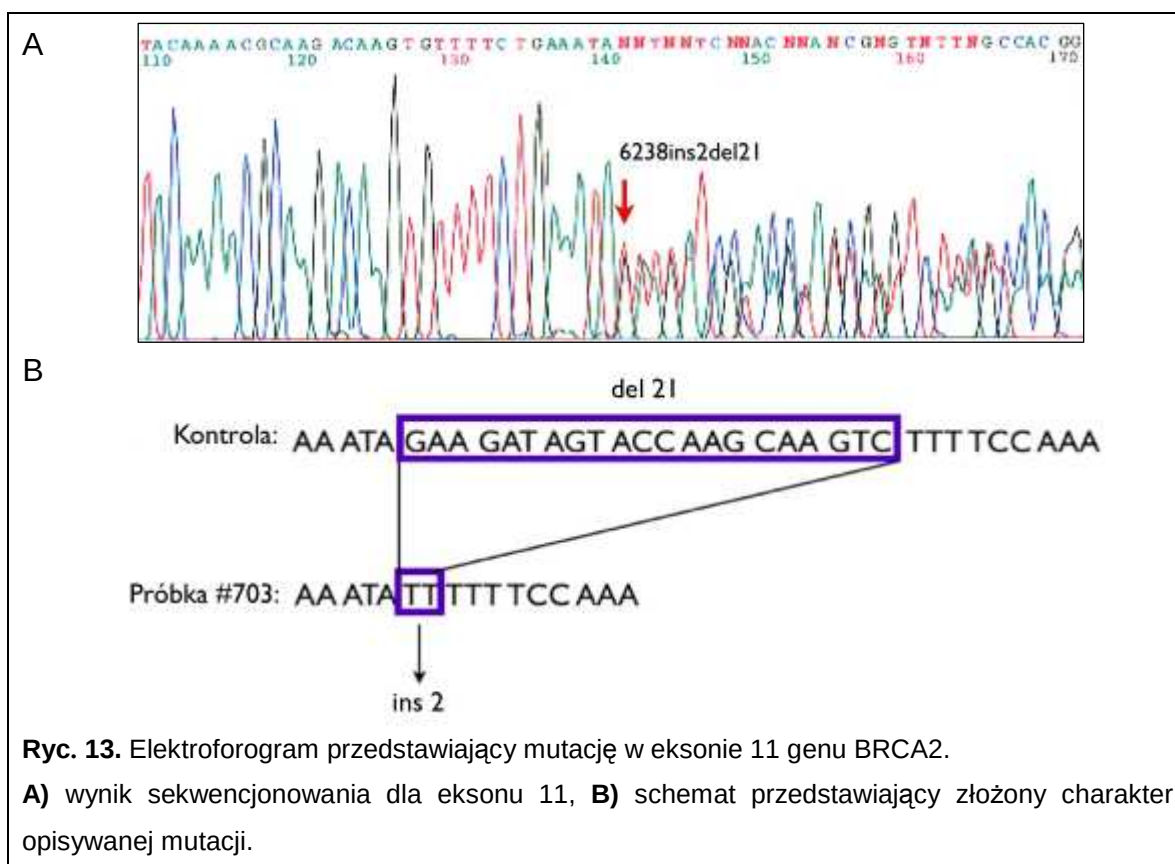


Ryc. 11. Elektroforogram przedstawiający heterozygotyczną mutację w eksonie 11 genu *BRCA1* zidentyfikowaną u rodziny #1064. **A)** wynik analizy DHPLC dla ampliconu 11-6 obejmującego fragment eksonu 11; **B)** wynik sekwencjonowania fragmentu 11-6 uwidaczniający delecję pięciu nukleotydów.

W rodzinie #1064 wykazano obecność pięcionukleotydowej delecji w eksonie 11 genu *BRCA1* (2991del5 (c.2872_2876del5)). Mutacja nie była wcześniej opisana zarówno w bazie BIC jak i w literaturze. Probandka, u której wykryto mutację zachorowała na raka piersi i raka jajnika (odp. w wieku 37 i 43 lat). W rodzinie pacjentki nie zanotowano innych zachorowań na te nowotwory. Zidentyfikowana delecja powoduje przesunięcie ramki odczytu i przedwczesną terminację syntezy białka (kodon stop - 969).



Inną mutacją znaną w genie *BRCA1* była zamiana guaniny na adeninę w sekwencji konsensus (miejsce donorowe w intronie 14), co wskazywało na potencjalny wpływ wykrytej zmiany na proces składania mRNA. W celu potwierdzenia powyższej hipotezy wyizolowano RNA i wykonano reakcję RT-PCR. Elektroforeza badanej próbki wykazała na żelu obecność dwóch produktów reakcji PCR, dla allelu prawidłowego (o długości 554pz) oraz krótszego allelu, w którym doszło do utraty eksonu 14 genu *BRCA1* (427pz). Wykonana reakcja sekwencjonowania potwierdziła obecność delecji w krótszym z produktów. Jej konsekwencją jest przesunięcie ramki odczytu i przedwczesna terminacja translacji (kodon stop - 1462).

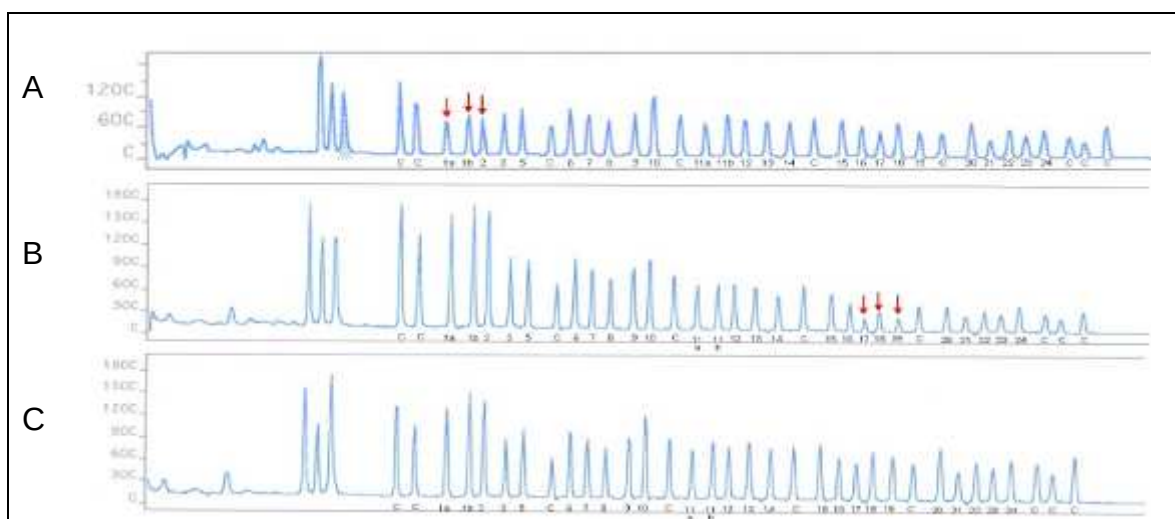


W genie *BRCA2*, w rodzinie #703, zidentyfikowano złożoną mutację, która polegała na jednoczesnej delecji 21 par zasad i insercji dwóch (6238ins2del21 (c.6010_6030delinsTT)). Zmiana nie została dotychczas opisana (zarówno w bazie BIC jak i w literaturze). U probantki zdiagnozowano raka piersi w wieku 42 lat, a jej matka oraz siostra matki zachorowały na raka piersi w wieku 40 lat.

6.2. Wyniki analizy dużych delecji i insercji w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

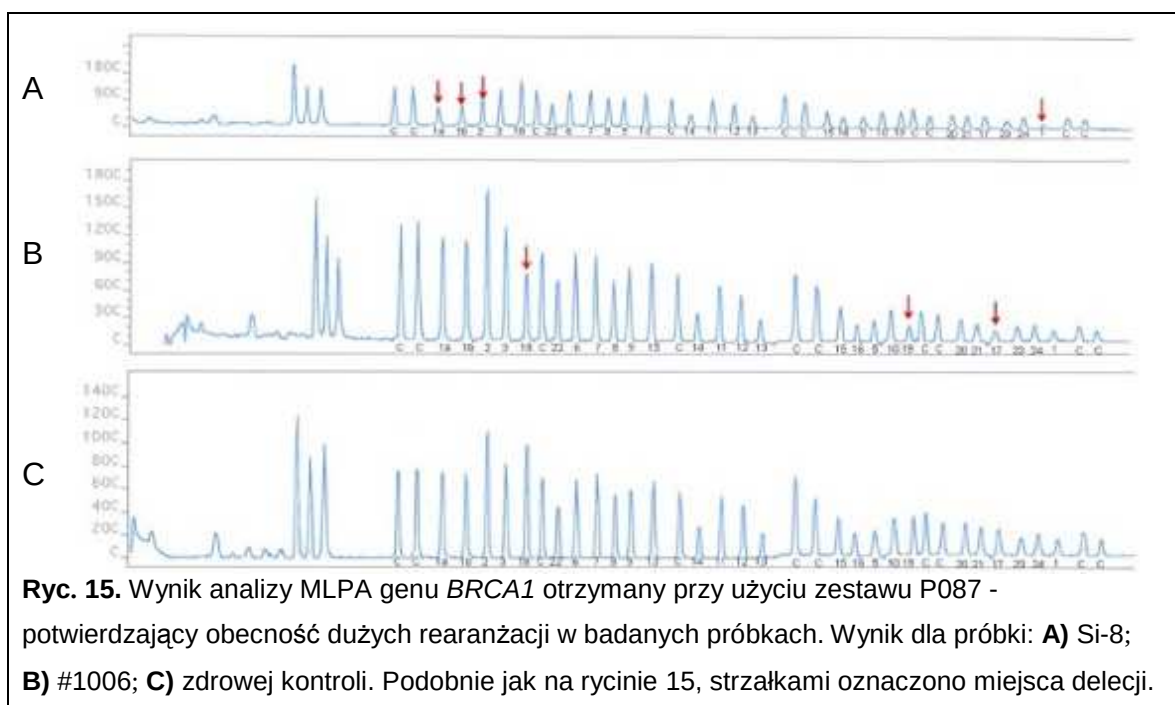
W grupie 43 chorych, z wykluczoną mutacją punktową w genach *BRCA1/2*, a u których stwierdzono silną agregację zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, wykonano analizę dużych rearanżacji. W jej wyniku zidentyfikowano dwie mutacje w genie *BRCA1*: pierwszą obejmującą eksony 1A, 1B i 2 (del1A-2) oraz drugą - delecję eksonów od 17 do 19 (del17-19). Ze względu na ograniczoną ilość dostępnego materiału, nie wykonano analizy mającej na celu dokładne określenie miejsc pęknięć, a jedynie ograniczono się do potwierdzenia występowania opisanych zmian w drugiej niezależnej reakcji MLPA. Powyższą reakcję przeprowadzono przy zastosowaniu kitu P087, stworzonego przez producenta (MRC Holland) do weryfikacji wyników analizy *BRCA1* wykonanych przy pomocy zestawu P002. Oba zestawy mają różne miejsca hybrydyzacji sond (za wyjątkiem sondy zlokalizowanej w eksonie 24 genu *BRCA1*) co pozwala na rzetelną ocenę otrzymanych wyników.

Poniżej przedstawiono elektroforogramy, w których zostały zidentyfikowane mutacje.



Ryc. 14. Wynik analizy MLPA genu *BRCA1* otrzymany przy użyciu zestawu P002.

A) panel przedstawia wynik dla próbki #Si-8 w której stwierdzono obecność delecji eksonów 1A-2. Nieprawidłowe piki oznaczono strzałkami; **B)** obraz MLPA uzyskany dla próbki #1006, ze stwierdzoną delecją eksonów 17-19 (ponownie miejsce delecji oznaczono strzałkami; **C)** Dolny panel pokazuje wynik analizy MLPA dla próbki kontrolnej zdrowej osoby.



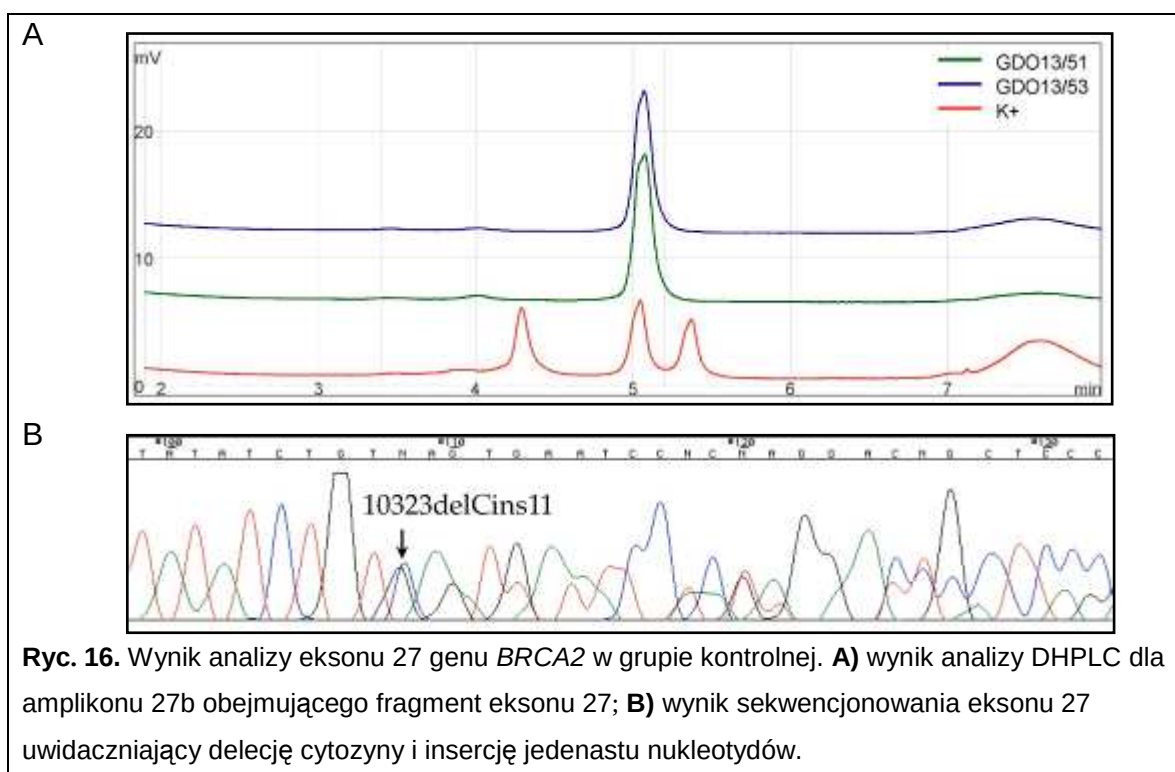
W rodzinie pacjentki #Si-18, u której stwierdzono obecność delecji 1A-2, występowała bardzo silna agregacja zachorowań na raka piersi. U samej probantki zdiagnozowano raka piersi w wieku 39 lat. Natomiast pacjentka #1006 ze stwierdzoną delecją eksonów 17-19 zachorowała na obustronnego raka piersi, odpowiedni w wieku 33 i 41 lat, oraz na raka jelita grubego w wieku 50 lat. Brak jest natomiast informacji na temat występowania agregacji zachorowań w jej rodzinie.

6.3. Znaczenie wariantu sekwencyjnego c.10095delCins11 (c.10095delCins11) w występowaniu rodzinnej agregacji zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

W wyniku analizy sekwencji genu *BRCA2*, u dwóch niespokrewnionych pacjentek (rodziny: #21, #907), wykazano obecność złożonej mutacji w obrębie eksonu 27. Wspomniana zmiana polega na delecji cytozyny i insercji jedenastu par zasad w pozycji 10323 (10323delCins11 (c.10095delCins11)) i skutkuje skróceniem białka o 79 aminokwasów (kodon stop - 3369). W bazie BIC została zarejestrowana 11 razy i ze względu na swoją lokalizację na samym końcu genu, została uznana za zmianę bez znaczenia klinicznego.

W pierwszej rodzinie (#21), u probantki zdiagnozowano raka jajnika w wieku 54 lat, a u jej ojca raka piersi w wieku lat 80. Sekwencjonowanie eksonu 27 genu *BRCA2* w materiale uzyskanym ze skrawka guza pacjentki nie wykazało utraty heterozygotyczności. Natomiast w rodzinie #907, probantka zachorowała na raka jajnika w wieku 51 lat oraz raka piersi (brak dokładnych danych co do wieku diagnozy), a u jej siostry zdiagnozowano raka jajnika. W tym przypadku nie uzyskano materiału do wykonania badania utraty heterozygotyczności.

W celu określenia ewentualnego patogennego charakteru wykrytej zmiany zbadano częstość jej występowania w grupie kontrolnej 1150 nieselekcjonowanych, anonimowych próbek krwi noworodków z woj. Pomorskiego. Do tego celu zostały wykorzystane próbki, które są standardowo gromadzone do badań przesiewowych w kierunku fenyloketonurii. Analiza wykazała obecność siedmiu ($n=7/1240$; 0,6%) heterozygot. Natomiast w grupie badanej częstość ta wyniosła 1,3% ($2/155$, $p=0,3$). Poniżej przedstawiono przykładowy chromato- i elektroforogram próbek w których omawiany wariant został zidentyfikowany.



6.4. Analiza kosegregacyjna w rodzinach z mutacją w genach *BRCA1/2*.

Analizę kosegregacyjną przeprowadzono w 33 rodzinach, z czego 30 miało stwierdzoną mutację w genie *BRCA1*, a trzy w *BRCA2*. Zgodnie z częstością wykrytych mutacji, najliczniejszą grupę w badaniach nad kosegregacją stanowiły rodziny w których występowała mutacja 5382insC (c.5266dupC) w eksonie 20 genu *BRCA1* (11/33; 33%), 300T>G (c.181T>G) w eksonie 5 (9/33; 27%) oraz 3819del5 (c.3700_3704del5) w eksonie 11 (5/33, 15%). Pozostałą grupę (około 25%) stanowiły pojedyncze rodziny.

W badaniach kosegregacyjnych najliczniej były reprezentowane rodziny #718 i #PLG2/734, u których stwierdzono obecność mutacji 5382insC (c.5266dupC) oraz rodzina #779 u której występowała mutacja w eksonie 2 genu *BRCA1*. W przypadku pierwszej z rodzin, badaniami objęto 14 członków i zidentyfikowano ośmiu nosicieli, w tym sześć kobiet. W rodzinie o PLG2 na badania zgłosiło się dziewięć osób, zidentyfikowano trzy zdrowe kobiety oraz jednego mężczyznę będących nosicielami mutacji, a w rodzinie 779 badaniem objęto pięć osób, mutację wykryto u dwóch zdrowych kobiet i jednego mężczyzny.

W pozostałych rodzinach badaniami kosegregacyjnymi obejmowano średnio dwie lub trzy osoby. Ogółem, u wszystkich członków rodzin objętych badaniami (poza probantkami), wykryto 48 mutacji w genie *BRCA1* i dwie mutacje w genie *BRCA2* oraz zidentyfikowano 33 zdrowe nosicielki, które objęto programem badań profilaktycznych. Szczegółowe dane dotyczące rodzin, ich członków oraz zidentyfikowanych mutacji przedstawiono w tab. 23. W przypadku zdrowych nosicielek mutacji, w kolumnie dotyczącej wieku zachorowania członków rodziny, stosowano symbol UA, natomiast jeśli nosicielem mutacji w genie *BRCA1* był mężczyzna to w tej samej kolumnie, obok UA, umieszczano dodatkowo symbol kwadratu. Szczegółowy opis zastosowanych symboli znajduje się w legendzie pod tab. 23, natomiast wybrane rodowody pacjentek z mutacją umieszczono w załącznikach.

Tab. 23. Analiza kosegregacyjna w rodzinach pacjentek u których stwierdzono obecność mutacji genów *BRCA1* lub *BRCA2*

Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane - zmiana nukleotydowa	Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Lp.	Numer badania/numer badania członka rodziny	Klasyfikacja rodziny ^c	Obecność lub brak mutacji	Wiek zachorowania członków rodziny ^d
BRCA1								
2	185delAG (c.68_69delAG)	F	Założycielska	1	779	BC/OC	TAK	OC (52)
					779/803		TAK	OC (47)
					779/928		TAK	UA (□)
					779/1249		TAK	UA
					779/1263		TAK	UA
5	300T>G (c.181T>G)	M	Założycielska	2	brca_14	BC	TAK	BC (43)
					brca_14/35		NIE	UA
					brca_14/36		TAK	UA
				3	brca_49	BC	TAK	OC (41)
					brca_49/938		NIE	UA (□)
					brca_49/52		TAK	BC (32)
					brca_49/941		NIE	UA (□)
				4	671	BC/OC	TAK	BC (32)
					671/1261		NIE	UA
					671/1258		TAK	UA
					671/1264		NIE	UA
				5	906	BC/OC	TAK	OC (37); BC (44)
					906/2355		TAK	UA
				6	1017	BC/OC	TAK	BC (43); OC (55)
					1017/1167		NIE	UA
				7	1058	BC	TAK	BC (39)
					1058/1216		NIE	UA
				8	1267	BC	TAK	BC (48)
					1267/1266		TAK	UA
					1267/1374		NIE	UA

^{a)} F: mutacja powodująca zmianę ramki odczytu (ang. *frameshift*); M: mutacja powodująca zmianę aminokwasową (ang. *missense*); N: mutacja powodująca powstanie kodonu "STOP" (ang. *nonsense*); S: mutacja powodująca powstanie błędu w procesie składania mRNA (ang. *splice*) ^{b)} Ilukrotnie mutację odnotowana w bazie BIC ^{c)} BC – rak piersi; OC – rak jajnika; ^{d)} UA – zdrowa; (□): badanie mutacji *BRCA1* wykonano u mężczyzny.

Tab. 23. Analiza kosegregacyjna w rodzinach pacjentek u których stwierdzono obecność mutacji genów *BRCA1* lub *BRCA2*

Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane - zmiana nukleotydomowa	Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Lp.	Numer badania/numer badania członka rodziny	Klasyfikacja rodziny ^c	Obecność lub brak mutacji	Wiek zachorowania członków rodziny ^d
BRCA1								
5	300T>G (c.181T>G)	M	Założycielska	9	1280	BC/OC	TAK	BC (38); BC (43); OC (47)
					1280/1382		TAK	JA
				10	1764	BC/OC	TAK	BC (52)
					1764/1765		NIE	JA
11	2682C>T (c.2563C>T)	N	BIC(4) ^b	11	brca_6	BC	TAK	BC (27)
					brca_6/1175		NIE	JA
	2991del5 (c.2872_2876del5)	F	Dotychczas nie opisana	12	1064	BC/OC	TAK	BC (37); OC (43)
					1064/1286		TAK	JA
					1064/1287		TAK	JA
	3819del5 (c.3700_3704del5)	F	Powtarzająca się	13	brca_12	OC	TAK	OC (47)
					brca_12/871		TAK	OC (63)
				14	1150	BC/OC	TAK	JA
					1150/1159		TAK	JA
					1150/2011		NIE	JA
				15	1262	BC	TAK	JA
					1262/1349		TAK	JA
					1262/1357		TAK	JA
				16	1763	BC/OC	TAK	OC (47)
					1763/1782		TAK	JA
					1763/1783		TAK	JA
14	IVS14+1G>A (c.4484+1G>A)	S	Dotychczas nie opisana	18	brca_3	BC/OC	TAK	OC (61)
					brca_3/890		TAK	JA
20	5382insC (c.5266dupC)	F	Założycielska	19	brca_39	OC	TAK	OC (51)
					brca_39/673		TAK	OC (49)
					brca_39/833		TAK	JA
					brca_39/868		NIE	JA

Znaczenie zastosowanych skrótów i symboli zamieszczono pod pierwszą częścią tab. 23

Tab. 23. Analiza kosegregacyjna w rodzinach pacjentek u których stwierdzono obecność mutacji genów *BRCA1* lub *BRCA2*

Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane - zmiana nukleotydowa	Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Lp.	Numer badania/numer badania członka rodziny	Klasyfikacja rodziny ^c	Obecność lub brak mutacji	Wiek zachorowania członków rodziny ^d
BRCA1								
20	5382insC (c.5266dupC)	F	Założycielska	20	brca 46	BC/OC	TAK	OC (40)
					brca 46/787		NIE	JA
				21	718	BC/OC	TAK	OC (58)
					718/677		TAK	BC(33)
					718/919		TAK	JA
					718/920		TAK	JA
					718/922		NIE	JA (□)
					718/954		NIE	JA
					718/955		NIE	JA
					718/1008		TAK	BC (47); BC (57); OC (66)
					718/1009		TAK	JA
					718/1010		TAK	JA
					718/1029		TAK	JA
					718/884		TAK	JA (□)
					718/885		TAK	JA (□)
					718/653		TAK	JA
				22	PLG2/734	OC	TAK	OC (48)
					PLG2/1521		NIE	JA (□)
					PLG2/1524		TAK	JA (□)
					PLG2/1380		NIE	JA
					PLG2/1381		TAK	JA
					PLG2/PLG6		TAK	OC (63)
					PLG2/1393		TAK	JA
					PLG2/782		TAK	OC (51)
					PLG2/748		TAK	JA
				23	876	OC	TAK	OC (47)
					876/877		TAK	JA
				24	908	BC/OC	TAK	OC (44)
					908/1288		TAK	JA
				25	910	BC/OC	TAK	BC (50); OC (51)
					910/898		NIE	JA
					910/903		TAK	BC (48); OC (56)

Znaczenie zastosowanych skrótów i symboli zamieszczono pod pierwszą częścią tab. 23

Tab. 23. Analiza kosegregacyjna w rodzinach pacjentek u których stwierdzono obecność mutacji genów *BRCA1* lub *BRCA2*

Ekson	Nazewnictwo powszechnie używane - zmiana nukleotydowa	Typ mutacji ^a	Rodzaj mutacji	Lp.	Numer badania/numer rodziny	Klasyfikacja rodziny ^c	Obecność lub brak mutacji	Wiek zachorowania członków rodziny ^d
BRCA1								
20	5382insC (c.5266dupC)	F	Założycielska	26	990	BC	TAK	BC (40)
					990/1000		NIE	JA
					990/1109		NIE	JA
					990/1110		NIE	JA
				27	1131	BC	TAK	BC (45)
					1131/1179		TAK	JA
					1131/1168		TAK	BC (29)
				28	1197	BC	TAK	BC (33)
					1197/1247		NIE	JA
					1197/1252		NIE	JA (□)
					1197/1244		TAK	JA (□)
				29	1306	BC	TAK	BC (33)
					1306/1657		TAK	JA
22	5465G>A (c.5346G>A)	N	Powtarzająca się	30	brca_9	OC	TAK	OC (63)
					brca_9/856		TAK	JA
					brca_9/1775		NIE	JA
BRCA2								
10	2022del5 (c.1794_1798del5)	F	BIC(1) ^b	31	1724	BC/OV	TAK	BC (45); BC (45)
					1724/2089		NIE	JA
					1724/2096		TAK	JA
11	4088delA (c.3860delA)	F	BIC(2) ^b	32	brca_62	BC	TAK	BC (37)
					brca_62/63		TAK	BC (37)
					brca_62/725		NIE	JA
21	8876delC (c.8648delC)	F	Dotychczas nie opisana	33	832	BC/OV	TAK	BC (40)
					832/1389		NIE	JA

Znaczenie zastosowanych skrótów i symboli zamieszczono pod pierwszą częścią tab. 23

6.5. Związek wybranych parametrów klinicznych z obecnością i rodzajem mutacji w genach *BRCA1/2*.

U pacjentek, u których stwierdzono występowanie germinalnej mutacji w genie *BRCA1* lub *BRCA2*, podjęto próbę analizy niektórych parametrów klinicznych (takich jak: kryteria klasyfikacji rodziny, rodzaj nowotworu, wiek zachorowania) w zależności od obecności i rodzaju wykrytej mutacji.

6.5.1. Analiza częstości i rodzaju wykrytych mutacji w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi oraz piersi i/lub jajnika.

Spośród 95 rodzin, w których występowała agregacja zachorowań na raka piersi, mutacje zidentyfikowano u 27, co stanowi około 28,4%. U rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi i jajnika wykazano obecność mutacji w 58,2% (n=32/55). Należy zauważyć, iż wszystkie rodziny z agregacją zachorowania wyłącznie na raka jajnika miały stwierdzoną mutację w jednym z genów *BRCA*.

W trzech rodzinach, w których wystąpił męski rak piersi zidentyfikowano: jedną mutację w genie *BRCA1* - 300T>G (c.181T>G) (#brca_49), jedną mutację w genie *BRCA2* - 4088delA (c.3860delA) (#brca_62) oraz obecność, opisanego powyżej, wariantu sekwencyjnego w genie *BRCA2* - 10323delCins11 (c.10095delCins11).

W genie *BRCA1*, zarówno w rodzinach z agregacją raka piersi, jak również piersi i/lub jajnika, najczęstsza była mutacja założycielska 5382insC (c.5266dupC), która stanowiła odpowiednio:

- w rodzinach z agregacją raka piersi (BC) - 43% wszystkich mutacji wykrytych w genie *BRCA1*
- w rodzinach z agregacją raka piersi i jajnika (BC/OC) - 48%
- w rodzinach z agregacją raka jajnika (OC) - 60%

Wśród rodzin z rakiem piersi drugie co do częstości były mutacje zlokalizowane w eksonie 11 genu *BRCA1*, a następnie mutacja 300T>G (c.181T>G) w eksonie piątym. W rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi i jajnika, powyższa

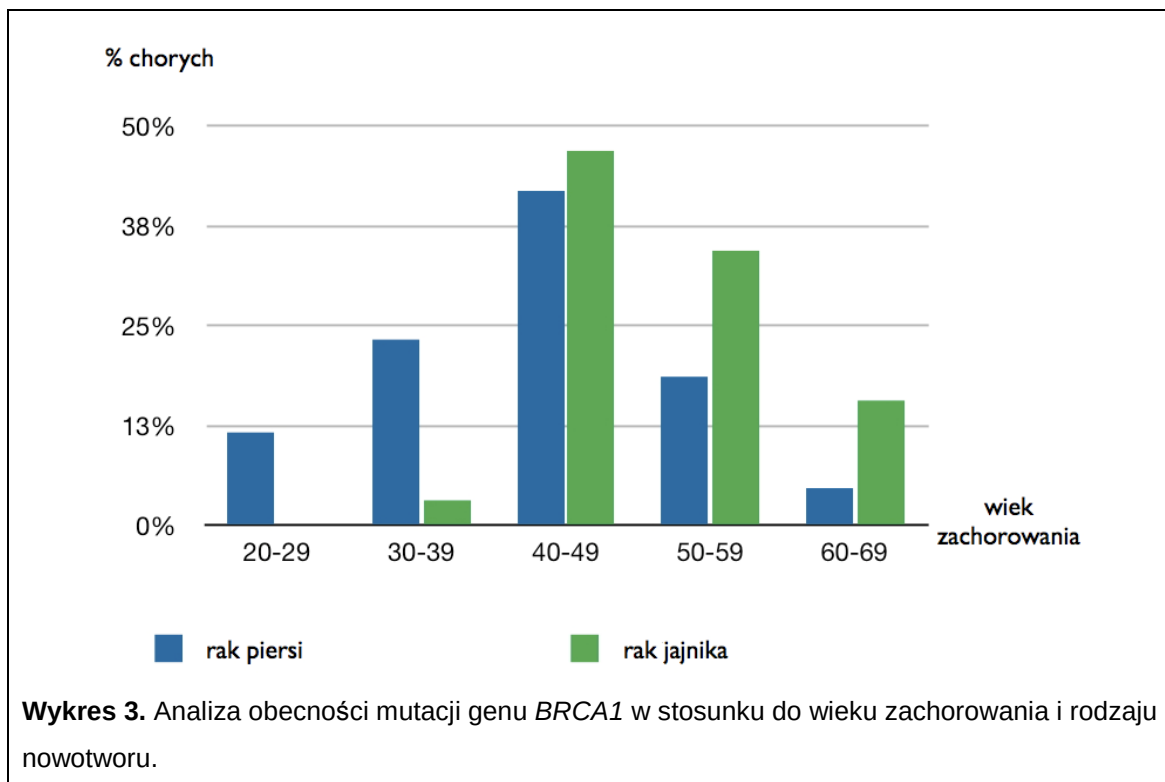
kolejność była odwrócona, tzn. drugą co do częstości zmianą w genie *BRCA1* była mutacja 300T>G (c.181T>G) w eksonie piątym, a następnie mutacje zlokalizowane w eksonie 11 tego genu.

Ze względu na małą liczbę rodzin ze stwierdzoną mutacją w genie *BRCA2* (n=7) - nie zaobserwowano podwyższonej częstości mutacji w tym genie (zwłaszcza w tzw. regionie OCCR – *ovarian cancer cluster region* - obejmującym ekson 11) u pacjentek z rakiem jajnika. Rozkład mutacji zidentyfikowanych w genie *BRCA2* przedstawiał się następująco:

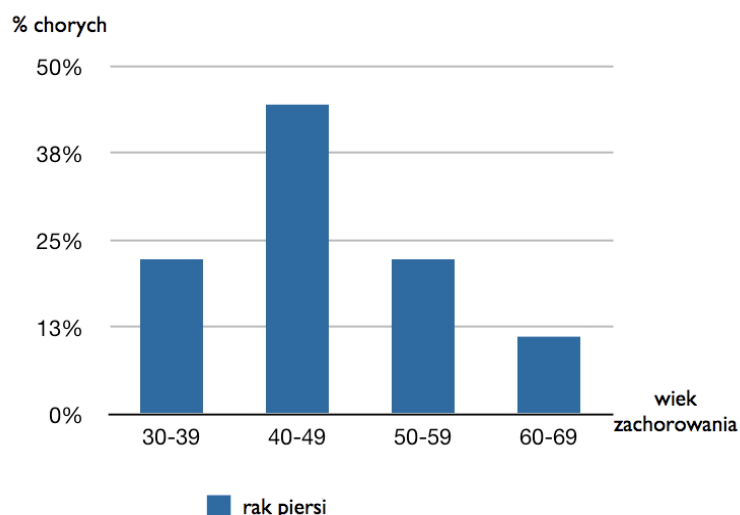
- w eksonie 10 mutacje wykryto u dwóch rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi i jednej na raka piersi i/lub jajnika.
- w eksonie 11 mutacje opisano u dwóch rodzin z agregacją zachorowań wyłącznie na raka piersi
- w eksonie 16 i 21 mutacje opisano u jednej rodziny z zachorowaniami na raka piersi i jednej na raka piersi i/lub jajnika.

6.5.2. Analiza obecności i rodzaju mutacji w stosunku do rodzaju nowotworu i wieku zachorowania.

Średni wiek zachorowania na raka piersi wśród nosicielek mutacji genu *BRCA1* wyniósł 42,9 lat - najmłodsza pacjentka w chwili rozpoznania miała 26 lat, a najstarsza 66. W przypadku raka jajnika, wartości te przedstawiają się następująco: średni wiek zachorowania wyniósł 50,4 lata, a najmłodsza i najstarsza pacjentka w chwili diagnozy miały odpowiednio 37 i 66 lat. Poniżej zamieszczono wykres obrazujący rozkład wieku w momencie diagnozy dla nosicielek mutacji (Wykres 3).

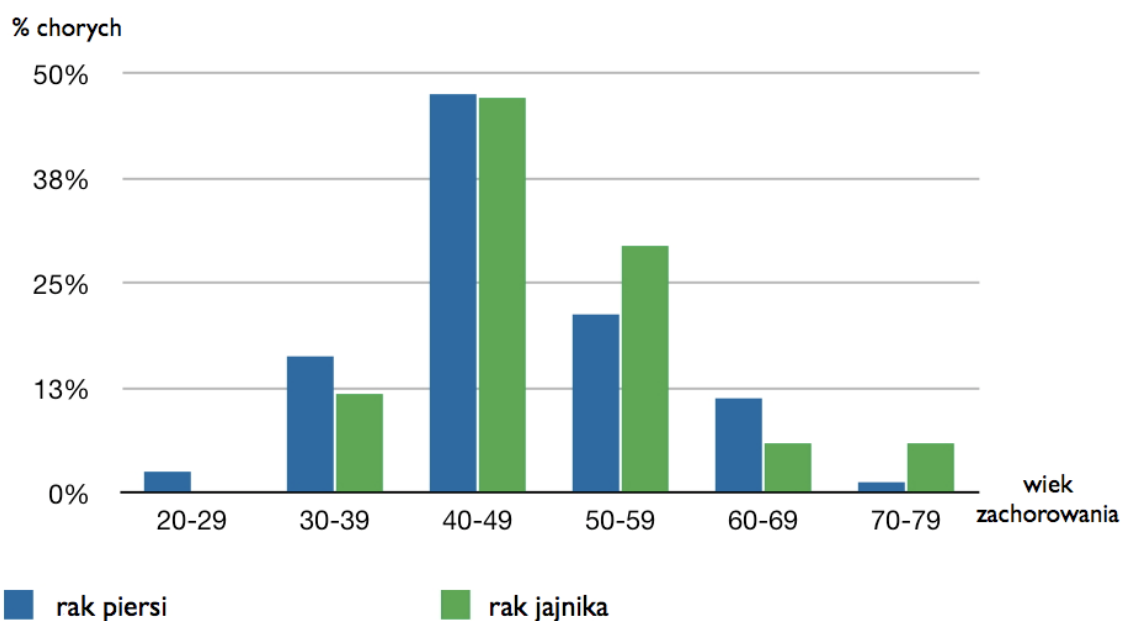


W przypadku mutacji w genie *BRCA2* średni wiek zachorowania na raka piersi wyniósł 46,3 lat, a najmłodsza i najstarsza pacjentka w chwili diagnozy miały odpowiednio 37 i 66 lat. Poniżej zamieszczono wykres obrazujący rozkład wieku w momencie diagnozy raka piersi u nosicielek mutacji *BRCA2* (Wykres 4). W niniejszej grupie badanej wśród nosicielek mutacji genu *BRCA2*, tylko u dwóch rozpoznano raka jajnika, jednakże tak mała grupa uniemożliwiła wykonanie podobnej analizy dla tego nowotworu.



Wykres 4. Analiza obecności mutacji genu *BRCA2* w stosunku do wieku zachorowania na raka piersi.

U pacjentek, u których nie wykazano obecności mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*, średni wiek zachorowania na raka piersi wyniósł 47 lat, najmłodsza i najstarsza pacjentka w momencie diagnozy miały odpowiednio 27 i 70 lat. Rak jajnika w tej grupie chorych był diagnozowany pomiędzy 31 a 73 rokiem życia, a wartość średnia wyniosła 48,8 lat. Dokładny rozkład wieku zachorowania na te nowotwory przedstawiono na poniższym wykresie (Wykres 5).



Wykres 5. Rozkład wieku zachorowania na raka piersi i jajnika u pacjentek, u których nie wykazano obecności mutacji w genach *BRCA1* lub *BRCA2*.

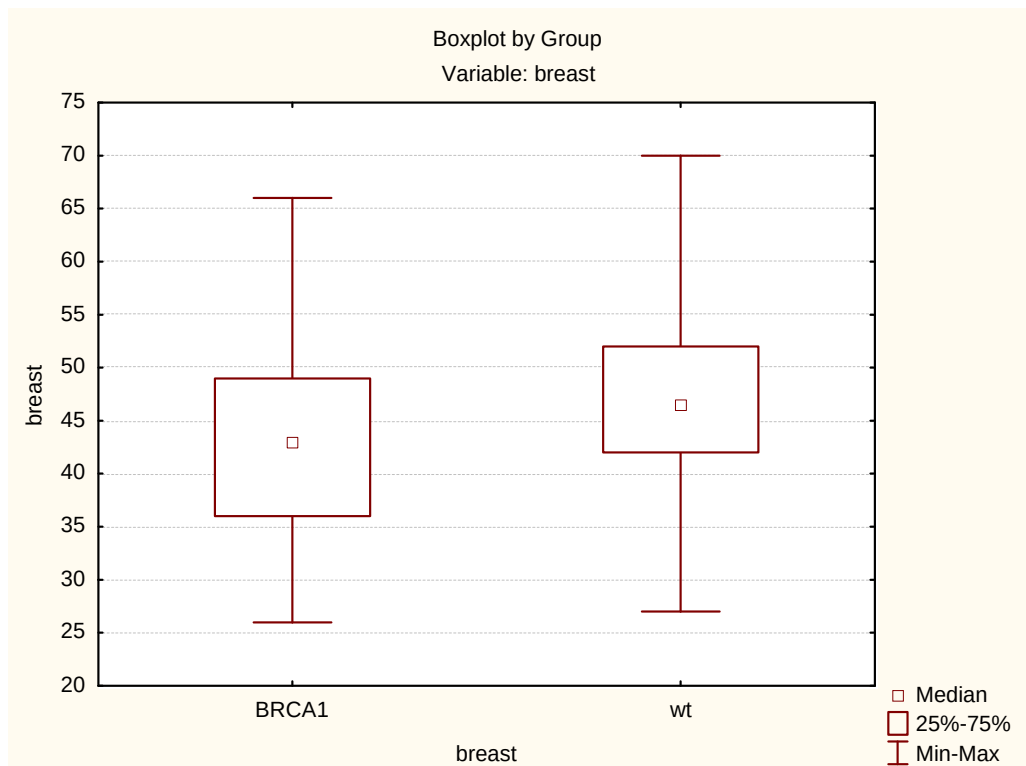
6.5.3. Statystyczna analiza zależności wieku zachorowania na raka piersi i/lub jajnika od obecności mutacji w genach *BRCA1/2*

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej średniego wieku zachorowania na raka piersi i/lub jajnika, pacjentki podzielono na następujące grupy:

- chore na raka piersi z mutacją w genie *BRCA1*
- chore na raka piersi z mutacją w genie *BRCA2*
- chore na raka piersi bez mutacji w wyżej wymienionych genach
- chore na raka jajnika z mutacją w genie *BRCA1*
- chore na raka jajnika bez mutacji w wyżej wymienionych genach

Ze względu na bardzo małą liczbę przypadków zachorowania na raka jajnika wśród nosicielek mutacji w genie *BRCA2* (n=2), dla potrzeb analizy statystycznej nie wyodrębniono tej grupy pacjentek.

Analiza statystyczna średniego wieku zachorowania w poszczególnych grupach pacjentek wykazała zależność pomiędzy średnim wiekiem rozpoznania raka piersi a obecnością germinalnej mutacji w genie *BRCA1* ($p=0.0398$) (Wykres 6). Natomiast nie wykazano takiej zależności pomiędzy wiekiem zachorowania na ten nowotwór a obecnością mutacji w genie *BRCA2* ($p=0.718$) oraz wiekiem zachorowania na raka jajnika a obecnością mutacji w genie *BRCA1* ($p=0.599$)



Wykres 6. Porównanie median wieku zachorowania na raka piersi w grupie nosicielek mutacji genu *BRCA1* oraz w grupie chorych, u których nie stwierdzono obecności mutacji w genie *BRCA1/2*.

7.Dyskusja

Rak piersi to najczęstszy złośliwy nowotwór kobiecy, z jego powodu każdego roku umiera w Polsce 5 tysięcy kobiet (Jeziorski, 2004). Wzrost zachorowań na ten nowotwór przypada pomiędzy 45 a 54 rokiem życia i ulega obniżeniu w okresie menopauzy (Jacobs i wsp., 1999). Natomiast rak jajnika jest uznawany za piątą przyczynę zgonu u kobiet, a odsetek zachorowań na ten nowotwór jest wysoki w krajach wysokorozwiniętych. Wzrost zachorowań przypada pomiędzy 40 a 70 rokiem życia (Stempczyńska i Potemski, 2004).

W rodzinach, w których występuje agregacja zachorowań na raka piersi, mutacje w genach o wysokiej penetracji *BRCA1* i *BRCA2* są wykrywane średnio u 16-25% chorych (Beggs, 2009; Pharoah, 2008).

W niniejszej pracy przeprowadzono kompletną analizę sekwencji kodujących genów *BRCA1* i *BRCA2* oraz podjęto próbę określenia związku pomiędzy obecnością niesklasyfikowanego wariantu sekwencyjnego 10323delCins11 (c.10095delCins11) w genie *BRCA2* a ryzykiem wystąpienia raka piersi i/lub jajnika. Dodatkowo w grupie 43 kobiet z silnie obciążonym wywiadem, wykonano badanie MLPA mające na celu określenie częstości i ewentualnego spektrum dużych rearanżacji w genie *BRCA1/2* w populacji polskiej. Zgodnie z naszą wiedzą było to pierwsze badanie MLPA na takim materiale wykonane w Polsce.

Efekt założyciela i zróżnicowanie regionalne a częstość mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* u chorych z rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

Należy zauważyć, iż częstość oraz spektrum mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* wykazuje znaczne zróżnicowanie geograficzne. Wyróżnia się populacje i grupy etniczne, w których na skutek izolacji, występuje kilka charakterystycznych mutacji. Zjawisko to określane jako efekt założyciela, jest wyraźnie widoczne w populacji fińskiej czy Żydów Aszkenazyjskich (Johannesdottir, 1996; Fodor, 1998). Niemniej obecność panelu mutacji charakterystycznych dla danego kraju opisano również w Szwecji, Norwegii, Austrii, Belgii, Wielkiej Brytanii, Rosji, na Węgrzech oraz we francuskojęzycznej części Kanady (Gayther, 1995; Shattuck-Eidens, 1995; Andersen, 1996; Johannsson, 1996; Wagner, 1996; Dorum, 1997;

Gayther, 1997a; Peelen, 1997; Ramus, 1997; Shattuck-Eidens, 1997; Tonin, 1998).

W roku 2000 Górski i wsp. opublikowali wyniki analizy mutacji genów *BRCA1/2* w grupie 66 polskich rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika (Górski, 2000). Wykazano obecność siedmiu różnych rodzajów mutacji, z których sześć było zlokalizowanych w genie *BRCA1* a jedna w *BRCA2*. Trzy spośród mutacji znajdujących się w *BRCA1* powtórzyły się kilkakrotnie i stanowiły ogółem 83% wszystkich wykrytych mutacji (5382insC (c.5266dupC) - 51%, 300T>G (c.181T>G) - 20%; 4153delA (c.4034delA) - 11%). Na tej podstawie autorzy zaklasyfikowali Polskę do grupy krajów, charakteryzujących się bardzo ograniczonym spektrum mutacji oraz silnym efektem założyciela. Podobnie wysoka częstość powyższych mutacji (91%, n=111/122) wystąpiła w drugim badaniu tego zespołu (Górski, 2004). W badaniu tym, najczęstszą była mutacja 5382insC (c.5266dupC) (n=68/122; 56%), drugą i trzecią były odpowiednio zmiana 300T>G (c.181T>G) (n=31/122; 25%) oraz 4153delA (c.4034delA) (n=12/122;10%). Jednakże zgodnie z naszymi obserwacjami populacja polska jest bardziej złożona i niejednorodna, niż stwierdzili to autorzy cytowanych powyżej prac (Perkowska, 2003; Ratajska, 2008). Niewątpliwie za założycielskie należy uznać mutacje 5382insC (c.5266dupC) w eksonie 20 oraz 300T>G (c.181T>G) w eksonie 5 genu *BRCA1*, które w naszej grupie badanej stanowią odpowiednio 46 i 21% wszystkich mutacji wykrywanych w tym genie (n=26/57; n=12/57). Należy jednak zauważyć, iż pozostałe mutacje, tak powtarzające się jak i zidentyfikowane tylko w pojedynczych rodzinach, wynoszą ponad 30%.

Interesujący wydaje się fakt, iż w badanej grupie pacjentów nie wykazano obecności mutacji 4153delA (c.4034delA) w eksonie 11, której częstość wyniosła w badaniach Górskiego aż 10 i 11%, i nasza obserwacja jest zgodna z wynikami innych prac wykonanych na polskiej populacji (Grzybowska 2000; van der Looij, 2000). W publikacji Szabo (Szabo & King, 1997) mutacja ta jest określana jako założycielska dla populacji rosyjskiej, również w dwóch niezależnych badaniach przeprowadzonych na populacji Litwy, wykazano jej niespotykane wysoką częstość (nawet do 56%), co może świadczyć o tym, że jest ona charakterystyczna dla tego obszaru Europy, a wysoka częstość 4153delA (c.4034delA) na terenie Polski północno-zachodniej może być związana

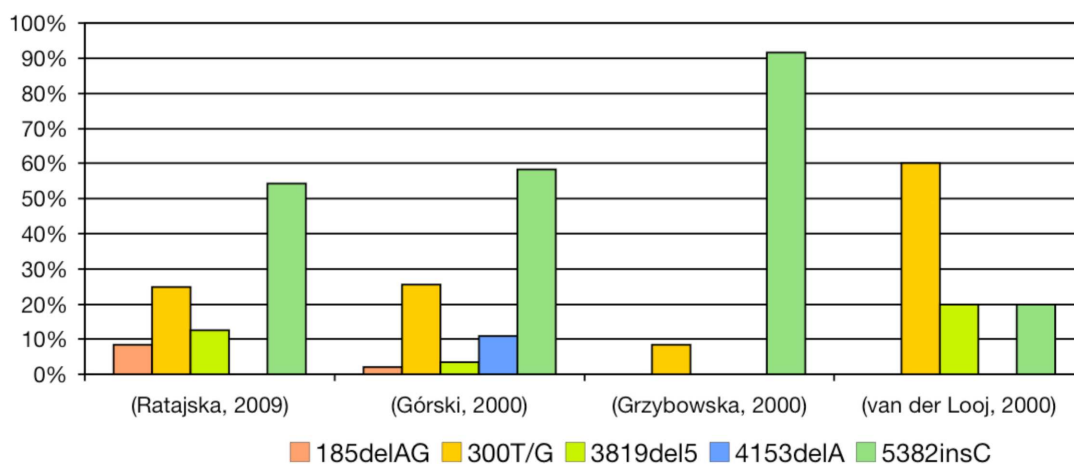
z migracjami ludności po II Wojnie Światowej (Gronwald, 2005; Tikhomirova, 2005).

W niniejszym badaniu wykazano stosunkowo wysoką częstość dwóch innych mutacji w genie *BRCA1*: 3819del5 (c.3700_3704del5) w eksonie 11 (11%) oraz 185delAG (c.68_69delAG) w eksonie 2 (7%). Mutacja 3819del5 (c.3700_3704del5) w badaniu Górskiego i wsp. (2000) występowała u dwóch rodzin, co stanowiło 6% wszystkich mutacji w genie *BRCA1*. Autorzy sugerowali, iż jest ona prawdopodobnie mutacją charakterystyczną dla ludności Polski. Jednakże w drugim badaniu tego zespołu (Górski, 2004) wspomniana delecja pięciu nukleotydów w eksonie 11 stanowiła jedynie 2,5% (n=3/122) zidentyfikowanych w tym genie mutacji, a autorzy nie podtrzymywali wcześniej postawionej tezy. Jednocześnie należy zauważyć, że zmiana 3819del5 (c.3700_3704del5) została odnotowana w bazie BIC aż 60 razy, zidentyfikowano ją m. in. w Danii, Niemczech, Francji, Włoszech (pojedyncze doniesienia) oraz w Czechach – gdzie jej występowanie w tej populacji zgłoszono aż 23 razy (BIC). W roku 2005 Pohlreich i wsp. (2005) opublikowali wyniki badania mutacji genów *BRCA1/2* u 151 kobiet z rakiem piersi. W badanej grupie mutacja 3819del5 (c.3700_3704del5) stanowiła 11,4% wszystkich zidentyfikowanych mutacji i była drugą najczęstszą zmianą (5382insC (c.5266dupC) – była znajdowana najczęściej i stanowiła 51,4%). W związku z powyższym, jeśli chcielibyśmy określić populację dla której jest ona mutacją charakterystyczną, to zgromadzone dane wskazują raczej na populację Czech niż Polski. Dlatego też należy sądzić, iż mutacja 3819del5 (c.3700_3704del5), która w badanej grupie występowała stosunkowo często, w naszej populacji powinna być traktowana jako mutacja powtarzająca się, a określenie jej częstości w populacji ogólnej wymaga przeprowadzenia badań populacyjnych, co jest przedmiotem innej rozprawy doktorskiej w Katedrze.

Poniżej przedstawiono częstości oraz spektrum mutacji powtarzających się genu *BRCA1* w populacji polskiej. Zamieszczone dane przygotowano na podstawie cytowanych publikacji oraz wyników niniejszej rozprawy (Tab. 24; Wykres 7). Ponadto podjęto próbę zestawienia częstości tych mutacji dla populacji polskiej z danymi zamieszczonymi w bazie BIC (Tab. 25; Wykres 8).

Tab. 24. Częstości mutacji założycielskich i powtarzających się genu *BRCA1* w populacji polskiej.

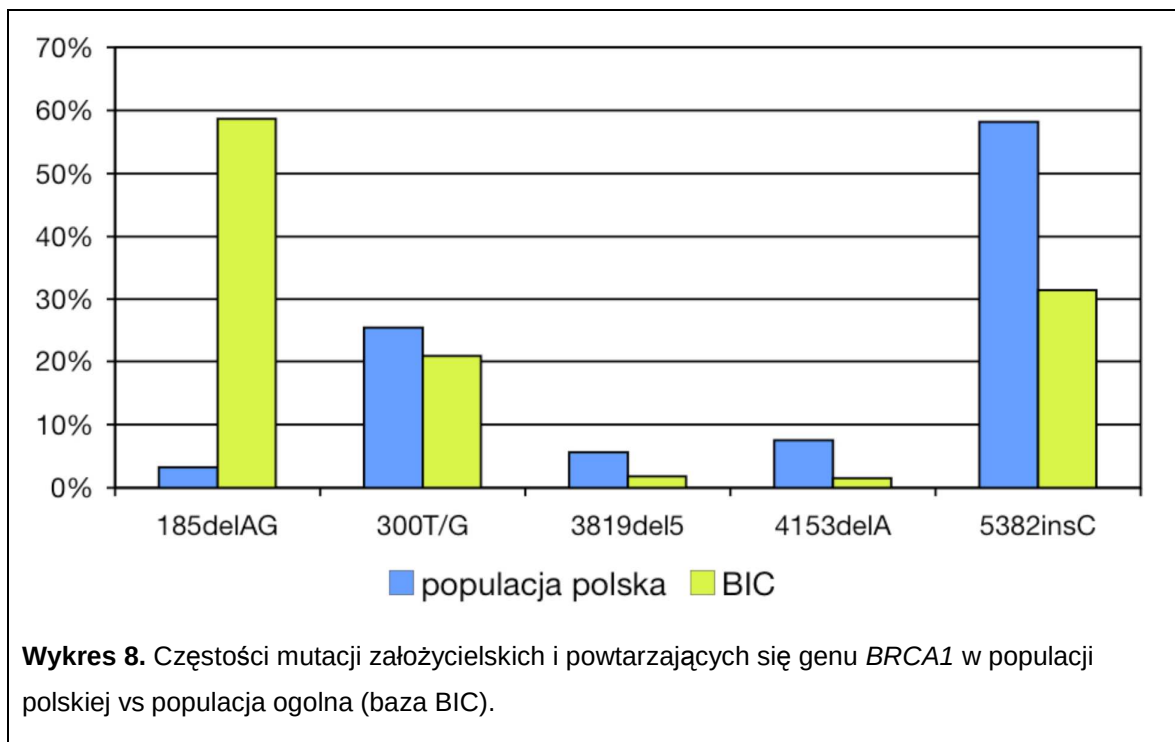
mutacja	Ratajska (2009)	Górski (2000) Górski (2004)	Grzybowska (2000)	van der Looj (2000)
185delAG (c.68_69delAG)	8%	6%	0%	0%
300T/G (c.181T>G)	25%	21%	8%	60%
3819del5 (c.3700_3704del5)	13%	6%	0%	20%
4153delA (c.4034delA)	0%	12%	0%	0%
5382insC (c.5266dupC)	54%	55%	92%	20%



Wykres 7. Częstości mutacji założycielskich i powtarzających się genu *BRCA1* w populacji polskiej.

Tab. 25. Częstości mutacji założycielskich i powtarzających się genu *BRCA1* w populacji polskiej i populacji ogólnej (baza BIC).

mutacja	częstość w populacji polskiej	częstość w bazie BIC
185delAG (c.68_69delAG)	3%	59%
300T/G (c.181T>G)	25%	21%
3819del5 (c.3700_3704del5)	6%	2%
4153delA (c.4034delA)	8%	1%
5382insC (c.5266dupC)	58%	31%



Interesujący wydaje się fakt, iż częstość mutacji 300T>G (c.181T>G) w eksonie 5 w populacji polskiej jest zbliżona do populacji światowej (dane reprezentowane przez BIC) i wynosi ona odpowiednio 25 i 21%. Dla pozostałych powtarzających się w naszej populacji zmian nie wykazano takiego podobieństwa.

Poza opisanymi powyżej, powtarzającymi się mutacjami, w analizowanej grupie pacjentów zidentyfikowano również takie mutacje, które zostały wykryte w pojedynczych rodzinach. W genie *BRCA1*, u jednej z pacjentek wykazano obecność mutacji 1629delC (c.1510delC), która została dwukrotnie odnotowana w bazie BIC, z czego jedno z doniesień pochodziło z Czech. U nosicielki powyższej mutacji zdiagnozowano obustronny raka piersi (w wieku 40 i 43 lat), a u jej siostry raka piersi w wieku 46 lat. Inna mutacja - 2682C>T (c.2563C>T) w eksonie 11 została zidentyfikowana u pacjentki z rakiem piersi (27 lat), a w rodzinie chorej występowała agregacja zachorowań na ten nowotwór. Powyższa mutacja została opisana w bazie BIC czterokrotnie, przy czym w dwóch przypadkach została zidentyfikowana u osób pochodzących z Europy zachodniej (w pozostałych dwóch, brak jest informacji na temat pochodzenia nosicieli). W eksonie 22 zidentyfikowano zamianę guaniny na adeninę w pozycji 5465 (c.5346G>A), której efektem jest powstanie

przedwczesnego kodonu STOP. U probantki zdiagnozowano raka jajnika w wieku 63 lat, a w rodzinie pacjentki występowała agregacja zachorowań na ten nowotwór. Interesujące jest, iż spośród 13 przypadków wystąpienia tej mutacji, które zostały zgłoszone do rejestru BIC, aż siedem pochodzi od chorych z Europy centralnej/wschodniej, w tym jeden przypadek został zgłoszony u chorej z terenu naszego kraju (W. Krzyżosiak).

W niniejszym badaniu w genie *BRCA2* zidentyfikowano siedem zmian (11%) i poza niesklasyfikowanym wariantem insercyjno-delecyjnym na końcu 3' genu, żadna z mutacji nie powtórzyła się. W innych badaniach przeprowadzonych w populacji polskiej, odsetek mutacji w tym genie wynosił od 2,8% w badaniu Górskiego i wsp. do 12% w badaniu van der Looij'a (Grzybowska 2000; van der Looij, 2000; Kwiatkowska, 2001). Należy zauważyć, że zarówno w badaniu Grzybowskiej i wsp. (2000) jak i van der Looija i wsp. (2000) w genie *BRCA2* zidentyfikowano dwie mutacje powtarzające się: 9631delC (c.9401delC) - która wystąpiła u trzech rodzin oraz 4075delGT (c.3847_3848delGT). Mutacja 9631delC (c.9401delC) wystąpiła także wśród pacjentów badanych przez Górskiego i wsp. (2004). Jednakże wspomniana praca była analizą wieloośrodkową, zatem możliwe jest iż osoby u których zidentyfikowano wspomnianą mutację były spokrewnione z pacjentami badanymi przez Grzybowską i wsp. (2000). Opublikowane wyniki naszych badań nie potwierdzają tezy o istnieniu w genie *BRCA2* mutacji charakterystycznych dla Polaków (Perkowska, 2003; Ratajska, 2008). Trzeba przy tym podkreślić, iż w naszej populacji występowanie mutacji w *BRCA2* jest stosunkowo rzadkie, a tak duże rozbieżności w ich częstości i spektrum mogą być spowodowane różnicami w kryteriach doboru pacjentów, stosowanymi technikami molekularnymi, jak również zróżnicowaniem regionalnym.

Wyniki badań wielu autorów wskazują, iż w rodzinach w których wystąpiły zachorowania u mężczyzn na raka piersi, znacznie częściej znajdowane są mutacje w genie *BRCA2*, aniżeli w genie *BRCA1* (Couch, 1996; Friedman, 1997; Mavraki, 1997; Haraldsson, 1998; Struwing, 1999; Sverdlov, 2000; Kwiatkowska, 2001; Basham, 2002; Frank, 2002; Ottini, 2003). W badanej grupie, jedynie w trzech rodzinach zdiagnozowano przypadki raka piersi u mężczyzny. W jednej z nich wykryto mutację w genie *BRCA1* (# brca_49 -

300T>G (c.181T>G)), a w pozostałych dwóch rodzinach zmiana była zlokalizowana w genie *BRCA2* – przy czym tylko jedna z nich jest mutacją (#brca_62 - 4088delA (c.3860delA)), druga to wspomniany wcześniej niesklasyfikowany wariant w eksonie 27 tego genu. Ze względu na tak małą liczbę rodzin z historią zachorowań na ten typ raka piersi, powyższe wyniki nie są reprezentatywne. Dodatkowo należy zauważyć, iż obecność mutacji w genie *BRCA1* u rodziny, w której wystąpił przypadek raka piersi u mężczyzny, wskazuje na konieczność analizy obu genów, a zawężenie analizy mutacji (w takich rodzinach) tylko do genu *BRCA2* mogłoby skutkować wynikami fałszywie negatywnymi.

Ocena spektrum i częstości dużych rearanżacji genu *BRCA1* w populacji polskiej.

W badaniach mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* coraz większą uwagę zwraca się na istnienie dużych rearanżacji i jednocześnie obserwuje się duże zróżnicowanie geograficzne w częstości ich występowania. W badaniu Montagna i wsp. (2003) wykazano, że duże rearanżacje w genie *BRCA1* stanowią nawet 1/3 wszystkich wykrywanych w tym genie mutacji. Podobne częstości znaleziono także w populacji holenderskiej (27-36%) (Petrij-Bosch, 1997; Hogervorst, 2003).

W niniejszej rozprawie, po raz pierwszy w Polsce, wykonano i opublikowano wyniki badań mających na celu identyfikację dużych rearanżacji w grupie 43 pacjentek. Do w/w badania kwalifikowano chore w rodzinach, w których występowała silna agregacja zachorowań na raka piersi i/lub jajnika oraz od których dysponowaliśmy wystarczającą ilością materiału potrzebnego do przeprowadzenia analiz. We wspomnianej grupie zidentyfikowano dwie duże delecje: jedną obejmującą ekson 1A-1B-2 oraz drugą rozciągającą się na eksony od 17 do 19 genu *BRCA1*, co stanowi częstość ok. 5%. Powyższy wynik wskazuje na przynależność Polski do grupy innych państw bałtyckich, gdzie częstość dużych delecji i insercji waha się od 2,1 w populacji Niemiec do 3,8% w populacji duńskiej (Thomassen, 2006; Engert, 2008). Istotnym ograniczeniem w interpretacji otrzymanego przez nas wyniku jest mała liczebność grupy badanej. Należy sądzić iż takie badania przeprowadzone wieloośrodkowo i na większej

grupie pacjentów w znaczny sposób mogłyby wpłynąć na wysokość występowania tych zmian w naszej populacji.

Podsumowując zatem, w populacji polskiej występują duże rearanżacje genów *BRCA1/2*, jednak określenie ich faktycznej częstości i spektrum pozostaje kwestią otwartą i wartą kontynuowania.

Analiza znaczenia obecności wariantu insercyjno-delecyjnego (10323delCins11 (c.10095delCins11)) w genie *BRCA2* dla wystąpienia agregacji zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

W wyniku analizy sekwencji kodującej genu *BRCA2* u dwóch niespokrewnionych rodzin wykazano obecność złożonej zmiany (10323delCins11 (c.10095delCins11)) w ostatnim eksonie tego genu, która skutkuje skróceniem białka o 49 aminokwasów.

Do niedawna uważano, że wszelkie zmiany zlokalizowane na końcu genu są klinicznie bez znaczenia – ponieważ w tej części *BRCA2* nie są kodowane żadne elementy istotne dla prawidłowego funkcjonowania białka. Wyniki badań populacyjnych wydawały się potwierdzać tą tezę, np. znajdujący się w eksonie 27 (w bliskim sąsiedztwie zidentyfikowanej przez nas zmiany) wariant sekwencyjny p.K3326X, ze względu na wysoką częstość występowania w populacji ogólnej (1%), uznano za prawdopodobny alternatywny kodon stop (Mazoyer, 1996). Z uwagi na powyższe obserwacje zmiana 10323delCins11 (c.10095delCins11) została określona jako *unknown variant* z zaznaczeniem, iż prawdopodobnie jest to neutralny polimorfizm (BIC).

Ostatnio opublikowane wyniki badań wydają się nie potwierdzać wcześniejszych obserwacji Esashi i wsp. (2005), którzy opublikowali wyniki badań wskazujące na kluczową rolę seryny w pozycji 3291 (C-terminalnej części *BRCA2*) dla interakcji pomiędzy *BRCA2* a *RAD51*. Poziom fosforylacji p.S3291 zmienia się w czasie trwania cyklu komórkowego, jest niski w fazie S i rośnie w trakcie mitozy. W przypadku uszkodzenia DNA poziom fosforylacji p.S3291 spada, co umożliwia oddziaływanie pomiędzy *BRCA2* i *RAD51*. Jednakże wyniki badań opublikowane w lipcu 2008 roku (Hucl, 2008) nie potwierdziły kluczowego znaczenia p.S3291 dla interakcji *BRCA2* z *RAD51*.

Należy nadmienić, iż w obydwu badanych w niniejszej pracy rodzinach, w których stwierdzono obecność zmiany 10323delCins11 (c.10095delCins11), wykluczono występowanie innych mutacji w genie *BRCA1/2*, zarówno punktowych, jak i dużych rearanżacji. Dodatkowo w obydwu przypadkach występowała agregacja zachorowań na raka piersi i/lub jajnika: u pacjentki #907 zdiagnozowano raka piersi oraz raka jajnika, a u jej siostry raka jajnika. Natomiast w rodzinie #21 u probantki wykryto raka jajnika w wieku 54 lat, a u jej ojca raka piersi (80 lat).

Ważnym aspektem w interpretacji faktycznego znaczenia wspomnianej zmiany są wyniki badania Martina i wsp. (2005) gdzie wykazano, że wspomniana wcześniej zmiana p.K3326X, występuje znacznie częściej u chorych z rodzinnym rakiem trzustki, w porównaniu z zachorowaniami sporadycznymi.

W bazie BIC zmiana p.K3326X została odnotowana 293 razy, a wśród naukowców są takie opinie, które wskazują na neutralny charakter w/w zmiany, jak również takie, które potwierdzają wyniki badań Martina i wsp. (2005). Na neutralny charakter zmiany p.K3326X mogą wskazywać współwystępowanie innej mutacji w genie *BRCA2* – 6503delTT (BIC) oraz porównywalna częstość p.K3326X w grupie kontrolnej (2,1%) i wśród pacjentów (2,5%). Natomiast jej negatywny wpływ na białko potwierdzają wyniki badań, w których została ona zidentyfikowana u dwóch sióstr chorych na raka piersi, przy czym nie ma informacji na temat współwystępowania innej zmiany w genie *BRCA1* lub *BRCA2* (BIC) lub też takie, gdzie zmiana ta nie wystąpiła w grupie kontrolnej (badanie przeprowadzone na populacji włoskiej - BIC).

Z uwagi na powyższe przesłanki przeprowadzono analizę obecności wariantu 10323delCins11 (c.10095delCins11) w grupie 1240 anonimowych próbek (wysuszonych plam krwi) pozostałych po przesiewowych badaniach nosicielstwa mutacji genu fenyloketonurii u noworodków z województwa pomorskiego. W badanej grupie wykazano obecność 10323delCins11 (c.10095delCins11) w siedmiu próbkach, co stanowi 0,6%. Wynik ten nie jest znamieny statystycznie ($p=0,3$), jednakże pełnej odpowiedzi na pytanie o znaczenie wspomnianych zmian dla zachowania prawidłowych funkcji *BRCA2* mogą udzielić jedynie badania funkcjonalne i bioinformatyczne. Jest to zagadnienie tym bardziej

interesujące, iż w ostatnim czasie wykazano, że zmiana zlokalizowana na końcu genu *BRCA1* - 5673insC (c.5553dupC), która powoduje nieznaczne wydłużenie polipeptydu, ma negatywny wpływ na powstające zmienione białko (Carvalho, 2009). Ze względu na aktualny stan wiedzy, wydaje się iż zmiana 10323delCins11 (c.10095delCins11) powinna być traktowana w poradnictwie genetycznym z dużą ostrożnością.

Analiza częstości mutacji oraz wieku zachorowania w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi vs na raka piersi i/lub jajnika.

W niniejszym badaniu przeprowadzono analizę mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* w grupie 155 chorych pochodzących z rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika. W rodzinach zakwalifikowanych do badania: 95 charakteryzowała agregacja zachorowań na raka piersi, 50 na raka piersi i raka jajnika, a w pięciu rodzinach stwierdzono wyłącznie występowanie raka jajnika.

Mutację stwierdzono u 28,4% rodzin z rakiem piersi i aż 58,2% rodzin, u których występowały zachorowania zarówno na raka piersi, jak i na raka jajnika. Jest to dwukrotnie większa częstość wykrytych mutacji ($p=0,00032$), podobnie w przypadku rodzin z agregacją zachorowań wyłącznie na raka jajnika – mutacje stwierdzono u 100% chorych ($p=0,00433$). Należy zatem podkreślić, iż współwystępowanie w rodzinach pacjentek tych dwóch nowotworów znacznie zwiększa prawdopodobieństwo identyfikacji mutacji w tych genach.

W analizowanych grupach nie wykazano znaczących różnic w lokalizacji mutacji w genie. Zarówno w grupie pacjentek z rakiem piersi, jak również piersi i/lub jajnika, najczęstsza była mutacja w eksonie 20 genu *BRCA1*, co potwierdza jej charakter mutacji założeńcielskiej. Nieznaczne różnice wystąpiły w przypadku drugiej, najczęstszej zmiany – dla rodzin z rakiem piersi były to mutacje zlokalizowane w eksonie 11 tego genu, a dla rodzin, gdzie występował rak piersi i jajnika, drugą co do częstości była mutacja 300T>G (c.181T>G) (ekson 5). Istnieją badania, w których sugeruje się, iż mutacje zlokalizowane w centralnej części genu (nukleotydy 2401–4191) predysponują do zachorowania na raka jajnika, natomiast mutacje zlokalizowane w C-terminalnej jego części (eksyony od 13 do 24) są częściej związane z wystąpieniem raka piersi (Gayther, 1995).

Badanie Gayther i wsp. (1995) zostało przeprowadzone na stosunkowo małej grupie 32 rodzin, gdzie wykryto 22 różne mutacje. Podobną zależność można zauważyć w dwóch badaniach Górskiego (2000;2004), gdzie częstość mutacji zlokalizowanych w centralnej części genu jest około trzykrotnie wyższa w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi i jajnika lub wyłącznie raka jajnika, niż w rodzinach z rakiem piersi. W naszej grupie chorych nie zaobserwowaliśmy takiej zależności; co więcej, to w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi mutacje są częściej zlokalizowane w eksonie 11 genu *BRCA1*. Podobnie w innych przeprowadzonych badaniach nie potwierdzono hipotezy na temat występowania zależności pomiędzy fenotypem a lokalizacją mutacji w genie (Phelan, 1996; Tonin, 1996; Levy-Lahad, 1997; Shattuck-Eidens, 1997; Stoppa-Lyonnet, 1997; Ford, 1998). Zarówno w badaniach Górskiego, jak i naszych brak jest wyraźnych różnic w częstości występowania mutacji 5382insC (c.5266dupC) i 300T>G (c.181T>G) u chorych z dziedzicznym rakiem piersi w porównaniu do chorych z dziedzicznym rakiem piersi i jajnika (Górski, 2000; Górski, 2004). Uważamy jednak, iż ze względu na dużą częstość mutacji 5382insC oraz 300T>G (c.181T>G), które dla naszego kraju są mutacjami założycielskimi, przeprowadzenie analizy zależności fenotypu od miejsca położenia mutacji może być utrudnione, a zaobserwowane różnice (dotyczące mutacji zlokalizowanych w eksonie 11 genu *BRCA1*) pomiędzy naszym badaniem, a badaniem Górskiego, mogą być kwestią przypadku oraz doboru badanej grupy i nie mają nic wspólnego z występowaniem w sekwencji genu *BRCA1* odpowiednika rejonu OCCR (w genie *BRCA2*).

Istnienie wspomnianego regionu OCCR (*the ovarian cancer cluster region*) jest także szeroko dyskutowane przez wielu autorów w piśmiennictwie. Analiza 25 rodzin z Wielkiej Brytanii wykazała po raz pierwszy zależność pomiędzy współwystępowaniem w rodzinach pacjentek przypadków raka jajnika a mutacją zlokalizowaną w obrębie eksonu 11 genu *BRCA2* (nukleotydy 3035–6629). Powyższy związek został potwierdzony w innym badaniu 45 rodzin ze stwierdzoną mutacją w tym genie, jednocześnie jednak wyniki wielu innych prac podważyły zasadność tej tezy. Ostatecznie badanie, w którym wzięło udział 20 różnych ośrodków zrzeszonych w *Breast Cancer Linkage Consortium* określiło nowe granice regionu OCCR (nukleotydy: 3059 - 4075 i 6503 – 6629)

(Johannesdottir, 1996; Gayther, 1997; Warner, 1999; Moslehi, 2000; Thompson, 2001; National Cancer Institute). Tak jak wspomniano wcześniej, w niniejszym badaniu nie zaobserwowano zależności pomiędzy występowaniem mutacji w regionie OCCR a częstszym występowaniem w rodzinach zachorowań na raka jajnika. Do podobnych wniosków doszedł Górski, jednakże trzeba nadmienić, iż zarówno w naszym badaniu, jak i badaniu Górskiego liczba rodzin ze zidentyfikowaną mutacją w genie *BRCA2* jest bardzo mała (Górski, i wsp., 2004).

W badanej grupie kobiet średni wiek zachorowania na raka piersi wśród nosicielek mutacji genu *BRCA1* wynosił 42,9 lat i był nieznacznie niższy w porównaniu z nosicielkami mutacji w genie *BRCA2*, dla których wynosił on 46,3 lat ($p=0.482$). Interesująca wydaje się obserwacja, iż pomiędzy pacjentkami ze stwierdzoną mutacją w genie *BRCA2* a pacjentkami, u których nie wykazano obecności mutacji, w żadnym z badanych genów nie zauważono różnicy w wysokości średniego wieku zachorowania i dla pacjentek *BRCA1/2* negatywnych wyniósł on 47 lat. Natomiast różnica była znamienna, gdy porównaliśmy średni wiek zachorowania na raka piersi wśród nosicielek mutacji w genie *BRCA1* vs pacjentek, u których w żadnym z powyższych genów, mutacji nie wykryto ($p=0.0398$). Podobnie we wspomnianych trzech grupach pacjentek kształtuje się krzywa zachorowania na ten nowotwór. Wydaje się, iż w badanej grupie obecność mutacji w genie *BRCA1* predysponowała - w sposób nieznaczny - do wystąpienia raka piersi w młodszym wieku.

W przypadku zachorowań na raka jajnika możliwe było porównanie nosicielek mutacji w *BRCA1* oraz pacjentek uznanych za negatywne; ze względu na bardzo sporadyczne występowanie raka jajnika wśród nosicielek mutacji *BRCA2* ($n=2$), nie było możliwe włączenie tych przypadków. I tak dla pacjentek ze stwierdzoną mutacją w genie *BRCA1* średni wiek zachorowania na ten nowotwór wynosił 50, 4 lat i nie różnił się zasadniczo od wartości uzyskanych dla pacjentek *BRCA1/2* negatywnych (49 lat) ($p=0.599$).

W niniejszej pracy obecność mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* wykazano u 41% ($n=64/155$) pacjentek z rakiem piersi i/lub jajnika. Jest to zgodnie z częstością mutacji uzyskaną w badaniach innych polskich ośrodków (od 32 do

53%), jak również grup zagranicznych, gdzie odsetek wykrywanych mutacji waha się od około 20% dla populacji holenderskiej, niemieckiej i japońskiej przez 47-62% w badaniach izraelskich, aż do 79% w badaniach rosyjskich (Szabo & King, 1997; Górski, 2000; van der Looij, 2000; Grzybowska, 2000; Jakubowska, 2001). W naszych wcześniejszych badaniach, które wchodzą w zakres prezentowanej pracy, częstość mutacji wyniosła od 27% do 67%. Należy jednak zauważyć, iż w obu pracach zastosowano inne metody detekcji mutacji, co może mieć bezpośredni wpływ na częstość ich wykrywania (Perkowska, 2003; Ratajska, 2008). Wydaje się, iż powyższa obserwacja może dotyczyć także innych wymienionych prac, tak polskich, jak i zagranicznych, a dokładne omówienie metodyki badań oraz problemów z nimi związanych zamieszczono w rozdziale 3.3. Należy podkreślić, że tak duża rozbieżność w częstości identyfikowanych mutacji może być również tłumaczona stosowaniem odmiennymi kryteriami przyjętych w celu kwalifikacji pacjentek do badania genetycznego lub, co jest równie prawdopodobne, występowaniem różnic populacyjnych i regionalnych. Ze względu na występowanie w regionie pomorskim efektu założyciela poprzez występowanie wysokiej częstości mutacji, zarówno powtarzających się, jak i zidentyfikowanych w pojedynczych przypadkach, jak również obecność dużych rearanżacji w genach *BRCA1/2* – opracowaliśmy, zamieszczoną poniżej, procedurę badania rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika.

1. Pierwszym etapem badania jest poszukiwanie obecności mutacji założycielskich w genie *BRCA1*: (300T>G (c.181T>G), 5382insC (c.5266dupC)) oraz powtarzających się (185delAG (c.68_69delAG), 3819del5 (c.3700_3704del5), 4153delA (c.4034delA)).
2. W przypadku nie wykrycia powyższych mutacji, u rodzin z silnie obciążonym wywiadem powinna zostać przeprowadzona analiza całej sekwencji kodującej (wraz z przylegającymi fragmentami intronów) genów *BRCA1/2*.
3. W rodzinach w których wykluczono występowanie mutacji punktowych konieczne jest wykonanie analizy MLPA w celu potwierdzenia/wykluczenia obecności dużych rearanżacji.

Uważamy, że z uwagi na heterogenność naszej populacji, ograniczenie analizy do poszukiwania mutacji założycielskich w genie *BRCA1* może skutkować nie wykryciem przypadków *BRCA1/2* pozytywnych co ma poważnie implikacje lekarskie.

8. WNIOSKI

1. W rodzinach zamieszkujących Polskę Północną, w których występuje agregacja zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, występuje efekt założyciela dwóch mutacji w genie *BRCA1*: 5382insC oraz 300T>G (67% wszystkich zmian). Jednocześnie obserwuje się wysoki odsetek innych powtarzających się mutacji, jak również mutacji występujących w pojedynczych rodzinach.
2. W grupie kobiet chorych na raka piersi i/lub jajnika częstość występowania mutacji punktowych oraz małych delecji i insercji w *BRCA1/2* wyniosła 41% co jest zgodne z obserwacjami w innych regionach Polski.
3. W 5% chorych na raka piersi i/lub jajnika, u których nie wykryto mutacji punktowych w genach *BRCA1/2*, wykazano obecność dużych delecji/insercji w tych genach. Określenie ich faktycznego spektrum oraz częstości występowania w Polsce pozostaje kwestią otwartą i wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań.
4. Zaobserwowanie zmiany 10323delCins11 (c.10095delCins11) w genie *BRCA2* w dwóch rodzinach z silną agregacją zachorowań na raka piersi i jajnika wskazuje na konieczność przeprowadzenia dalszych analiz w celu ostatecznego określenia patogennego charakteru tej zmiany.
5. Obecność germinalnej mutacji w genie *BRCA1* predysponuje do zachorowania na raka piersi w młodszym wieku, w porównaniu do chorych bez mutacji w genach *BRCA1/2*.
6. Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki nie potwierdzają istnienia zależności pomiędzy lokalizacją mutacji w genie *BRCA1*, a ryzykiem zachorowania na raka piersi lub jajnika.
7. W rodzinach z występującą agregacją zachorowań na raka piersi i jajnika, lub wyłącznie raka jajnika, mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* są identyfikowane około 2x częściej niż u rodzin z rakiem piersi.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Ahn J., Urist M., Prives C.: The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1039-1047. Review.
2. Andersen T.I., Borresen A.L. and Moller P.: A common BRCA1 mutation in Norwegian breast and ovarian cancer families? *Am J Hum Genet* 1996; 59: 486–487.
3. Anderson S.F., Schlegel B.P., Nakajima T., Wolpin E.S. and Parvin J.D.: BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nature Genet* 1998; 19: 254-256.
4. Antoniou A.C., Pharoah P.D.P., McMullan G.: A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer* 2002; 86: 76–83.
5. Arver B., Du Q., Chen J., Luo L. and Lindblom A.: Hereditary breast cancer: a review. *Cancer Biology* 2000; 10: 271–288
6. Baldeyron C., Jacquemin E., Smith J., Jacquemont C., De Oliveira I., Gad S., Feunteun J., Stoppa-Lyonnet D., Papadopoulos D.: A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene*. 2002; 21:1401-1410.
7. Ball S., Arolker M., Purushotham A.D.: Breast cancer, Cowden disease and PTEN-MATCHS syndrom. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 604-606
8. Basham V.M., Lipscombe J.M., Ward J.M.: BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4: R2.
9. Beggs A.D. and Hodgson S.V.: Genomics and breast cancer: the different levels of inherited susceptibility. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 855-856
10. Berek J.S. and Martínez-Maza O.: Molecular and biological factors in the pathogenesis of ovarian cancer. w: *Ovarian cancer* (red. Sharp F., Mason P., Blackett T. and Berek J.), Wyd. Chapman & Hall, London 1995; 3: 77-87.
11. Breast Cancer Information Core.: <<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>>

12. Bieche I. and Lindereau R.: Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chrom Cancer* 1995; 14: 227-251
13. Biernat W.: Podstawy genetyki molekularnej nowotworow, w: *Onkologia - podręcznik dla studentów i lekarzy* (red. Kordek R., Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A.), Wyd. Via Medica, Gdańsk 2004; 7-14.
14. Bignell G., Micklem G., Stratton M.R., Ashworth A., Wooster R.: The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 53-58.
15. Borresen A.L., Andersen T.I., Garber J.: Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res* 1992; 52: 3234–3236.
16. Bowcock A.M., Anderson L.A., Friedman L.S., Black D.M., Osborne-Lawrence S., Rowell S.E., Hall J.M., Solomon E., King M-C.: THRA1 and D17S183 flank an interval of <4 cM for the breastovarian cancer gene (BRCA1) on chromosome 17q21. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 718-722.
17. Braunstein GD.: Gynecomastia. *N Engl J Med* 1993; 328: 490–495.
18. Buchholz T.A., Weil M.M., Story M.D., Strom E.A., Brock W.A. and McNeese M.D.: Tumor Suppressor Genes and Breast Cancer. *Radiation Oncology Investigations* 1999; 7: 55–65.
19. Buyru N., Tigli H., Ozcan F., Dalay N.: Ras Oncogene Mutations in Urine Sediments of Patients with Bladder Cancer, *J Biochem Mol Biol.* 2003; 36: 399-402.
20. Carvalho M., Pino M.A., Karchin R., Beddor J., Godinho-Netto M., Mesquita R.D., Rodarte R.S., Vaz D.C., Monteiro V.A., Manoukian S., Colombo M., Ripamonti C.B., Rosenquist R., Suthers G., Borg A., Radice P., Grist S.A., Monteiro A.N., Billack B.: Analysis of a set of missense, frameshift, and in-frame deletion variants of BRCA1. *Mutat Res.* 2009; 660: 1-11.
21. Campeau P.M., Foulkes W.D., Tischkowitz M.D.: Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet* 2008; 124: 31-42.
22. Cantor S., Drapkin R., Zhang F., Lin Y., Han J., Pamidi S., Livingston D.M.: The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 2357-2362.

23. Cantor S.B., Bell D.W., Ganesan S., Kass E.M., Drapkin R., Grossman S., Wahrer D.C., Sgroi D.C., Lane W.S., Haber D.A., Livingston D.M.: BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001; 105: 149-160.
24. Carroll B.T., Couch F.J., Rebbeck T.R., Weber B.L.: Polymorphisms in PTEN in breast cancer families. *J Med Genet* 1999; 36: 94–96.
25. Casagrande J.T., Hanisch R., Pike M.C.: A case-control study of male breast cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 1326–1330.
26. Chai Y.L., Cui J., Shao N., Shyam E., Reddy P., Rao V.N.: The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/C1P1 promoter. *Oncogene* 1999; 18: 263–268.
27. Chan D.W., Chen B.P., Prithivirajsingh S., Kurimasa A., Story M.D., Qin J., Chen D.J.: Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* 2002; 16:2333-2338.
28. Chen C.F., Li S., Chen Y., Chen P.L., Sharp D., Lee W.H.: The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 1996b; 271: 32863–32868.
29. Chen J.D., Lindblom P., Lindblom A.: A study of the PTEN/MMAC1 gene in 136 breast cancer families. *Hum Genet* 1998; 102: 124–125.
30. Chen P-L., Chen C-F., Chen Y., Xiao J., Sharp Z.D. and Lee W-H.: The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5287-5292.
31. Chen Y., Farmer A., Chen C-F., Jones C., Chen P-L., Lee W-H.: BRCA1 is a 200 kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Res* 1996a; 56: 3168–3172.
32. Chen P.L., Chen C.F., Chen Y., Xiao J., Sharp Z.D., Lee W.H.: The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 5287-5292.
33. Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.

34. Chompret A., Brugieres L., Ronsin M.: P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer* 2000; 82: 1932–1937.
35. Cohen B.B., Porter D.E., Wallace M.R., Carothers A. and Steel C.M.: Linkage of a major breast cancer gene to chromosome 17q12-21: results from 15 dinburgh families. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 723-729.
36. Connor F., Bertwistle D., Mee P.J., Ross G.M., Swift S., Grigorieva E., Tybulewicz V.L., Ashworth A.: Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating BRCA2 mutation. *Nature Genet.* 1997; 17: 423–430.
37. Cortez D., Wang Y., Qin J., Elledge S.J.: Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999 ;286:1162-1166.
38. Couch F.J., Farid L.M., DeShano M.L.: BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 1996; 13: 123–125.
39. Cui J.Q., Wang H., Reddy E.S., Rao V.N.: Differential transcriptional activation by the N-terminal region of BRCA1 splice variants BRCA1a and BRCA1b. *Oncol Rep.* 1998; 5: 585-589.
40. Cybulski C., Huzarski T., Gorski B., Masojc B., Mierzejewski M., Debniak T., Gliniewicz B., Matyjasik J., Zlowocka E., Kurzawski G., Sikorski A., Posmyk M., Szwiec M., Czajka R., Narod S.A., Lubinski J.: A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res.* 2004; 64: 2677-2679.
41. de Jong M.M., Nolte I.M., Meerman G.J.T.: Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 2002; 39: 225–242.
42. de Jong M.M., Nolte I.M., Te Meerman G.J., van der Graaf W.T., Mulder M.J., van der Steege G., Bruinenberg M., Schaapveld M., Niessen R.C., Berends M.J., Sijmons R.H., Hofstra R.M., de Vries E.G., Kleibeuker J.H.: Colorectal cancer and the CHEK2 1100delC mutation. *Genes Chrom Cancer* 2005; 43: 377-382.
43. Deng C.X., Wang R.H.: Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: R113-123.
44. Devilee P., Cornelis R.S., Bootsma A., Bardoel A., van Vliet M., van Leeuwen I., Cleton F.J., de Klein A., Lindhout D., Vasen H.F.A., Cornelisse C.J. and Khan P.M.: Linkage to markers for the chromosome region 17q12-21 in 13 Dutch breast cancer kindreds. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 730-735.

45. Dobosz M.: Wspomagana komputerowo statystyczna analiza wyników badań, wyd. II. Akademicka Oficyna Wydawnicza "Exit", Warszawa, 2004; 62-364
46. Dorum A., Miller P., Kamsteeg E.J.: A BRCA1 founder mutation, identified with haplotype analysis, allowing genotype/phenotype determination and predictive testing. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2390–2392.
47. Dubeau L.: Ovarian cancer. w: *The genetic basis of human cancer* (red. Vogelstein B. and Kinzler K.W.), Wyd. McGraw-Hill, New York 1998; 615-620.
48. Durant J.R., Omura G.A.: Gynecologic neoplasm, w: *Medical Oncology* (red. Calabresi P., Schein P.S., Rosenberg S.A.), Wyd. Macmillan, Nowy Jork 1985; 191
49. Easton D.F., Bishop D.T., Ford D., Crockford G.P. and the Breast Cancer Linkage Consortium.: Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 678-701.
50. Easton D.F.: How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Res* 1999; 1: 14-17
51. Easton D.F., Antoniou A.C. and Thompson D.: The Genetic Epidemiology of Hereditary Breast Cancer, w: *Hereditary breast cancer* (red. Isaacs C. and Rebbeck T.R.), Wyd. Informa Healthcare, Nowy Jork 2008; 139-151
52. Eng C., Brody L.C., Wagner T.M.: Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *J Med Genet* 2001; 38: 824–833.
53. Engert S., Wappenschmidt B., Betz B., Kast K., Kutsche M., Hellebrand H., Goecke T.O., Kiechle M., Niederacher D., Schmutzler R.K., Meindl A.: MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Hum Mutat.* 2008; 29: 948-958
54. Esashi F., Christ N., Gannon J., Liu Y., Hunt T., Jasin M., West S.C.: CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature.* 2005; 434: 598-604.
55. Evans D.G., Birch J.M., Thorneycroft M., McGown G., Laloo F., Varley J.M.: Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 2002; 39: 941–944.

56. Fackenthal J.D., Marsh D.J., Richardson A.L.: Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations. *J Med Genet* 2001; 38: 159–164.
57. Firth H.V., Hurst J.A., Hall J.G.: Cowden syndrom (CS). w: Oxford desk reference: Clinical genetics. Wyd. Oxford University Press Inc., New York 2005; 4: 442-443
58. Fodor F.H., Weston A., Bleiweiss U.: Frequency and carrier risk associated with common BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 45–51.
59. Ford D., Easton D.F., Stratton M.: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676–689.
60. Foulds L.: Tumor progression. *Cancer Res* 1957; 17: 355–356
61. Frank T.S., Deffenbaugh A.M., Reid J.E.: Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1480–1490.
62. Friedberg E.C., Meira L.B.: Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage, version 5, DNA Repair (Amst) 2003; 2: 501–530.
63. Friedman J.M., Dill F.J., Hayden M.R., McGillivray B.C.: Genetyka (red. Limon J), Wyd. Urban & Partner, Wrocław 1997;187-195
64. Friedman L.S., Ostermeyer E.A., Lynch E.D., Szabo C.I., Anderson L.A., Dowd P., Lee M.K., Rowell S.E., Boyd J. and King M-C.: The search for BRCA1. *Cancer Res* 1994a; 54: 6374-6382.
65. Friedman L.S., Gayther S.A., Kurosaki T.: Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 313-319.
66. Garber J.E., Goldstein A.M., Kantor A.F., Dreyfus M.G., Fraumeni Jr J.F., Li F.P.: Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* 1991; 51: 6094–6097.
67. Garvin A.M., Attenhofer-Haner M., Scott R.J.: BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in 86 early onset breast/ovarian cancer patients. *J Med Genet* 1997; 3: 990–995.

68. Garvin A.M.: A complete protein truncation test for BRCA1 and BRCA2. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 226–234.
69. Gatei M., Zhou B.B., Hobson K., Scott S., Young D. and Khanna K.K.: Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem* 2001; 276: 17276-17280.
70. Gayther S.A., Warren W., Mazoyer S.: Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype–phenotype correlation. *Nat Genet* 1995;1: 428 - 433.
71. Gayther S.A., Harrington P., Russell P., Kharkevich G., Garkavtseva R.F. and Ponder B.A.: Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1239 - 1242.
72. Giordano S.H., Cohen D.S., Buzdar A.U., Perkins G., Hortobagyi G.N.: Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer* 2004; 101: 51-7.
73. Giordano S.H.: A review of the diagnosis and management of male breast cancer. *Oncologist* 2005; 10: 471-79.
74. Glover D.: Choroby nowotworowe, w: Choroby wewnętrzne (red. Jonderko G), Wyd. Urban & Partner, Wrocław 1995; 184-198
75. Goldgar D.E., Cannon-Albright L.A., Oliphant A., Ward J.H., Linker G., Swensen J., Tran T.D., Fields P., Uharriet P. and Skolnick M.H.: Chromosome 17q linkage studies of 18 Utah breast cancer kindreds. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 743-748.
76. Goldgar D.E., Fields P., Lewis C.M., Tran T.D., Cannon-Albright L.A., Ward J.H., Swensen J. and Skolnick M.H.: A large kindred with 17q-linked breast and ovarian cancer: genetic, phenotypic, and genealogical analysis. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 200-209.
77. Gowen L.C., Avrutskaya A.V., Latour A.M., Koller B.H., Leadon S.A.: BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science*. 1998 Aug; 281:1009-1012.
78. 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 the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1963-1968.

79. 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., Pluzańska M., Kilar E., Czudowska D., Wasko B., Miturski R., Kowalczyk J.R., Urbański K., Szwiec M., Koc J., Dębniak B., Rozmiarek A., Dębniak T., Cybulski C., Kowalska E., Tołoczko-Grabarek A., Zajątek S., Menkiszak J., Medrek K., Masojc B., Mierzejewski M., Narod S.A., Lubinski J.: High proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer* 2004; 110: 683-686.
80. Goss P.E., Reid C., Pintilie M.: Male breast carcinoma: a review of 229 patients who presented to the Princess Margaret Hospital during 40 years: 1955-1996. *Cancer* 1999; 85: 629–639.
81. 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.
82. Grzybowska E., Zientek H., Jasinska A., Rusin M., Kozłowski P., Sobczak K., Sikorska A., Kwiatkowska E., Górniak L., Kalinowska E., Utracka-Hutka B., Wloch 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.
83. Hall J.M., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B. and King M-C.: Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-1689.
84. Hanahan D., Weinberg RA.: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
85. Haraldsson K., Loman N., Zhang Q.X.: BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. *Cancer Res* 1998; 58: 1367-1371.
86. Harnden D.G., Maclean N., Langlands A.O.: Carcinoma of Klinefelter's syndrome. *J Med Genet* 1971; 8: 460–461.
87. Håkansson S., Johannsson O., Johansson U., Sellberg G., Loman N., Gerdes A.M., Holmberg E., Dahl N., Pandis N., Kristoffersson U., Olsson H., Borg A.: Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1068-1078.

88. Hedenfalk I.A., Ringnér M., Trent J.M., Borg A.: Gene expression in inherited breast cancer. *Adv Cancer Res.* 2002; 84: 1-34. Review.
89. Hoeijmakers J.H.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366–374.
90. Hofmann W., Gorgens H., John A.: Screening for large rearrangements of the BRCA1 gene in German breast or ovarian cancer families using semi-quantitative multiplex PCR method. *Hum Mutat* 2003; 22: 103–104.
91. Hogervorst F.B.: Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nature Genet.* 1995; 10: 208-212.
92. 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., Kluijt I., Dommering C., Verhoef S., Schouten J.P., van Veer L.J., Pals G.: Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res.* 2003; 63: 1449-1453
93. Huber C.G., Oefner P.J., Preuss E.: High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1061–1066.
94. Huber L.J., Yang T.W., Sarkisian C.J., Master S.R., Deng C.X., Chodosh L.A.: Impaired DNA damage response in cells expressing an exon 11-deleted murine Brca1 variant that localizes to nuclear foci. *Mol Cell Biol.* 2001 ; 21: 4005-4015.
95. Hucl T.; Rago C.; Gallmeier E.; Brody J.R.; Gorospe M.; Kern S.E.: A syngeneic variance library for functional annotation of human variation: application to BRCA2. *Cancer research* 2008; 68: 5023-5030.
96. Hultborn R., Hanson C., Kopf I.: Prevalence of Klinefelter's syndrome in male breast cancer patients. *Anticancer Res* 1997; 17: 4293–4297.
97. Hunter T.: Oncoprotein networks. *Cell* 1997; 88: 333-346
98. Jacobs T.W., Byrne C., Colditz G., Connolly J.L. and Schnitt S.J.: Radial scars in benign breast biopsy specimens and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 1999; 340: 430-436.

99. Jakubowska A., Górski B., Byrski T., Huzarski T., Gronwald J., Menkiszak J., Cybulski C., Debniak T., Hadaczek P., Scott R.J., Lubinski J.: Detection of germline mutations in the BRCA1 gene by RNA-based sequencing. *Hum Mutat* 2001; 18: 149-156.
100. Jensen R.A., Thompson M.E., Jetton T.L., Szabo C.I., van der Meer R., Helou B., Tronick S.R., Page D.L., King M-C. and Holt J.T.: BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin. *Nature Genet* 1996; 12: 303-308.
101. Jeziorski A.: Rak piersi, w: *Onkologia - podręcznik dla studentów i lekarzy* (red. Kordek R., Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A.), Wyd. Via Medica, Gdańsk 2004; 141-153.
102. Johannesdottir G., Gudmundsson J., Bergthorsson J.T.: High prevalence of the 999del5 mutation in Icelandic breast and ovarian cancer patients. *Cancer Res* 1996; 5: 3663–3665.
103. Johannsson O., Ostermeyer E.A., Hakansson S.: Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 441–450.
104. Karppinen S.M., Vuosku J., Heikkinen K., Allinen M., Winqvist R.: No evidence of involvement of germline BACH1 mutations in Finnish breast and ovarian cancer families. *Eur J Cancer*. 2003; 39: 366-371
105. Karppinen S.M., Heikkinen K., Rapakko K., Winqvist R.: Mutation screening of the BARD1 gene: evidence for involvement of the Cys557Ser allele in hereditary susceptibility to breast cancer. *J Med Genet*. 2004; 41: e114
106. Knudson A.G.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
107. Kolomietz E., Meyn M.S., Pandita A., Squire J.A.: The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 35: 97-112.
108. Kotnis A., Sarin R. and Mulherkar R.: Genotype, phenotype and cancer: Role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility. *J. Biosci.* 2005; 30: 93–102
109. Kozłowski P., Krzyzosiak W.J.: Combined SSCP/duplex analysis by capillary electrophoresis for more efficient mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: E71.

110. Kraakman-van der Zwet M., Overkamp W.J., van Lange R.E., Essers J., van Duijn-Goedhart A., Wiggers I., Swaminathan S., van Buul P.P., Errami A., Tan R.T., Jaspers N.G., Sharan S.K., Kanaar R., Zdzienicka M.Z.: Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 669-679.
111. Krenkel U., Schlichting L., Scherer A., Schumann R., Frech M., John J., Kabsch W., Pai E.F. and Wittinghofer A.: Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: Molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* 1990; 62: 539-548.
112. Krzemieniecki K.: Wybrane nowotwory - rak piersi, w: *Choroby wewnętrzne* (red. Szczeklik A), Wyd.: Medycyna Praktyczna, Kraków 2005; 2015-2018.
113. Kwiatkowska E., Teresiak M., Lamperska K.M., BRCA2 germline mutations in male breast cancer patients in the Polish population. *Hum Mutat* 2001; 17: 73
114. Levy-Lahad E., Catane R., Eisenberg S.: Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1059–1067.
115. Lewis A.G., Flanagan J., Marsh A., Pupo G.M., Mann G., Spurdle A.B., Lindeman G.J., Visvader J.E., Brown M.A., Chenevix-Trench G.; Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer.: Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH1, LMO4 and SFN in familial breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005; 7: R1005-1016
116. Lieber M.R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K.: Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 712–720.
117. Liede A.: A family with three germline mutations in BRCA1 and BRCA2. *Clin Genet* 1998; 54: 215–218.
118. Lim Y.K., Lau P.T., Ali A.B., Lee S.C., Wong J.E., Putti T.C., Sng J.H.: Identification of novel BRCA large genomic rearrangements in Singapore Asian breast and ovarian patients with cancer. *Clin Genet.* 2007; 71: 331-342.
119. Limon J.: Genetyczne podłoże chorób nowotworowych, w: *Genetyka molekularna* (red. Węgleński P.), PWN, Warszawa 2006; 400-429

120. Lindblom A., Rotstein S., Nordenskjöld M. and Larsson C.: Linkage analysis with markers on 17q in 29 Swedish breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 749-753.
121. Lipton L., Fleischmann C., Sieber O.M., Thomas H.J., Hodgson S.V., Tomlinson I.P., Houlston R.S., Contribution of the CHEK2 1100delC variant to risk of multiple colorectal adenoma and carcinoma. *Cancer Lett.* 2003; 200: 149-152
122. Lissowska J.: Rak piersi: etiologia i prewencja pierwotna. Rozprawa habilitacyjna, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2008; 14-29
123. Llamas J. and Brody L.C.: Biology of BRCA1- and BRCA2-associated carcinogenesis, w: Hereditary breast cancer (red. Isaacs C. and Rebbeck T.R.), Wyd. Informa Healthcare, Nowy Jork 2008; 139-151
124. Malkin D., Li F., Strong L.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233–1238.
125. Martin S.T., Matsubayashi H., Rogers C.D., Philips J., Couch F.J., Brune K., Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H., Goggins M.: Increased prevalence of the BRCA2 polymorphic stop codon K3326X among individuals with familial pancreatic cancer. *Oncogene*. 2005; 24: 3652-3656.
126. Mavraki E., Gray I.C., Bishop D.T.: Germline BRCA2 mutations in men with breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1428-1431.
127. Mazoyer S., Lalle P., Narod S.A., Bignon Y.J., Courjal F., Jamot B., Dutrillaux B., Stoppa-Lyonnet D. and Sobol H.: Linkage analysis of 19 French breast cancer families, with five chromosome 17q markers. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 754-760.
128. Mazoyer S., Dunning A.M., Serova O., Dearden J., Puget N., Healey C.S., Gayther S.A., Mangion J., Stratton M.R., Lynch H.T., Goldgar D.E., Ponder B.A., Lenoir G.M.: A polymorphic stop codon in BRCA2. *Nat Genet.* 1996; 14: 253-254.
129. McAllister K.A., Haugen-Strano A., Hagevik S., Brownlee H.A., Collins N.K., Futreal P.A., Bennett L.M. and Wiseman R.W.: Characterization of the rat and mouse homologues of the BRCA2 breast cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 1997; 57: 3121-3125.
130. McBride O.W., Merry D. and Givol D.: The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 130-134.

131. Meijers-Heijboer H., van den Ouweland A., Klijn J., Wasielewski M., de Snoo A., Oldenburg R., Hollestelle A., Houben M.: Low penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 2002; 31: 55-59
132. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal PA., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P.K., Norris F.H., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett JC., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A. and Skolnick M.H.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
133. Milner J., Ponder B., Hughes-Davies L., Seltman M. and Kouzarides T., Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 1997; 386: 772-773.
134. Montagna M., Dalla Palma M., Menin C., Agata S., De Nicolo A., Chieco-Bianchi L., D'Andrea E.: Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 1055-1061
135. Monteiro AN.: BRCA1: exploring the links to transcription. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:469-474. Review.
136. Morimatsu M., Donoho G., Hasty P.: Cells deleted for Brca2 COOH terminus exhibit hypersensitivity to gamma-radiation and premature senescence. *Cancer Res.* 1998; 58: 3441-3447.
137. Moslehi R., Chu W., Karlan B.: BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1259–1272.
138. Narod S.A., Feunteun J., Lynch H.T., Watson P., Conway T., Lynch J. and Lenoir G.M.: Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 1991; 338: 82-83.
139. National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program. http://seer.cancer.gov/cgi-bin/csr/1975_2003/search.pl#results (accessed May 2006).

140. Neish A.S., Anderson S.F., Schlegel B.P., Wei W. and Parvin J.D.: Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 847-853.
141. Neuhausen S.L., Swensen J., Miki Y., Liu Q., Tavtigian S., Shattuck-Eidens D., Kamb A., Hobbs M.R., Gingrich J., Shizuya H., Kim U-J., Cochran C., Futreal P.A., Wiseman R.W., Lynch H.T., Tonin P., Narod S., Cannon-Albright L., Skolnick M.H. and Goldgar D.E.: A P1-based physical map of the region from D17S776 to D17S78 containing the breast cancer susceptibility gene BRCA1. *Hum Mol Genet* 1994a; 3: 1919-1926.
142. Niezabitowski A.: *Patologia, w: Rak sutka* (red. Jassem J.), PWN, Warszawa 1998, 60-83.
143. Nowell P.: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23–28
144. Oefner P.J., Underhill P.A.: Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 1995; 57: A266.
145. Oldenburg R.A., Meijers-Heijboer H., Cornelisse C.J., Devilee P.: Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? *Oncology/Hematology* 2007; 63: 125–149
146. Ottini L., Masala G., D'Amico C.: BRCA1 and BRCA2 mutation status and tumor characteristics in male breast cancer: A population-based study in Italy. *Cancer Res* 2003; 63: 342-347.
147. Ouichi T., Monteiro A.N., August A., Aaronson S.A., Hanafusa H.: BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *PNAS USA* 1998; 95: 2302–2306.
148. Passarge E.: *Genetyka - ilustrowany przewodnik* (red. Mazurczak T), PZWL, Warszawa 2004; 316-335
149. Pasz-Walczak G.: Czynniki rakotwórcze, w: *Onkologia - podręcznik dla studentów i lekarzy* (red. Kordek R., Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A.), Wyd. Via Medica, Gdańsk 2004; 1-6.
150. Patel K.J., Yu V.P., Lee H., Corcoran A., Thistlethwaite F.C., Evans M.J., Colledge W.H., Friedman L.S., Ponder B.A., Venkitaraman A.R.: Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol. Cell.* 1998;1:347–357.

151. Paull T.T., Gellert M.: Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* 1999; 13:1276-1288.
152. Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M. and Bonner W.M.: A critical role for histone H2A.X in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000; 10: 886-895.
153. Paull T.T., Cortez D., Bowers B., Elledge S.J. and Gellert M.: Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 6086-6091.
154. Peelen T., van Vliet M., Petrij-Bosch A.: A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1041–1049.
155. Pharoah P.D.P.: *Low-Penetrance Genes in Breast Cancer*, w: *Hereditary breast cancer* (red. Isaacs C. and Rebbeck T.R.), Wyd. Informa Healthcare, Nowy Jork 2008; 127-137
156. Phelan C.M., Rebbeck T.R., Weber B.L.: Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nat Genet* 1996; 12: 309–311.
157. Phelan C.M., Dapic V., Tice B., Favis R., Kwan E., Barany F., Manoukian S., Radice P., van der Luijt R.B., van Nesselrooij B.P.M., Chenevix-Trench G., kConFab, Caldes T., de La Hoya M., Lindquist S., Tavtigian S.V., Goldgar D., Borg A., Narod S.A., Monteiro A.N.A.: Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J Med Genet* 2005; 42: 138–146
158. Perkowska M., Brozek I., Wysocka B., Haraldsson K., Sandberg T., Johansson U., Sellberg G., Borg A. and Limon J.: BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mut.* 2003; 21: 553-554.
159. Perrin-Vidoz L., Sinilnikova O.M., Stoppa-Lyonnet D., Lenoir G.M. and Mazoyer S.: The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet*, 2002; 11,23: 2805–2814.
160. Petrij-Bosch A., Peelen T., van Vliet M., van Eijk R., Olmer R., Drusedau M., Hogervorst F.B., Hageman S., Arts P.J., Ligtenberg M.J.: BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat. Genet.* 1997; 17: 341–345.

161. Plummer S.J.: Detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4: 1989-1991.
162. Pohlreich P., Zikan M., Stribrna J., Kleibl Z., Janatova M., Kotlas J., Zidovska J., Novotny J., Petruzalka 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.
163. Preisler-Adams S., Schonbuchnerb I., Fiebigc B., Wellinga B., Dworniczaka B., Weber B.H.F.: Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 168: 44–49.
164. Prost M.E., Hautz W.: Siatkówczak. Opracowanie z 2003, źródło: www.okulistykadziecieca.pl/biuletyn/siatkowczak.doc
165. Puget N., Gad S., Perrin-Vidoz L.: Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 858–865.
166. Ramus S.J., Kote-Jarai Z., Friedman L.S.: Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Hungarian families with breast or breast–ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1242–1246.
167. Rapakko K., Allinen M., Syrjakoski K.: Germline TP53 alterations in Finnish breast cancer families are rare and occur at conserved mutation-prone sites. *Br J Cancer* 2001; 84: 116–119
168. Ratajska M., Brozek I., Senkus-Konefka E., Jassem J., Stepnowska M., Palomba G., Pisano M., Casula M., Palmieri G., Borg A. and Limon J.: BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland, *Oncol Rep* 2008; 19: 263-268.
169. Ready K.J. and Arun B.K.: Genetic Predisposition to Breast Cancer and Genetic Counseling and Testing. w: *Breast cancer* (red. Hunt K. K., Robb G. L., Strom E. A., and Ueno N. T.), Wyd. 2008 Springer Science + Business Media, LLC, New York, 2008; 3: 58-81.
170. Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M.: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998; 273:5858-5868.

171. Rosen E.M., Fan S., Isaacs C.: BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 533–548.
172. Rosenblatt K.A., Thomas D.B., McTiernan A.: Breast cancer in men: aspects of familial aggregation. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 849–854.
173. Rouse J., Jackson S.P.: Interfaces between the detection, signaling and repair of DNA damage. *Science* 2002; 297: 547–551.
174. Saleh-Gohari N., Bryant H.E., Schultz N., Parker K.M., Cassel T.N., Helleday T.: Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:7158-7169
175. Sasco A.J., Lowenfels A.B., Pasker-de Jong P.: Review article: epidemiology of male breast cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *Int J Cancer* 1993; 53: 538–549.
176. Schutte M., Seal S., Barfoot R., Meijers-Heijboer H., Wasielewski M., Evans D.G., Eccles D., Meijers C., Lohman F., Klijn J., van den Ouweland A., Futreal P.A., Nathanson K.L., Weber B.L., Easton D.F., Stratton M.R., Rahman N.: Breast Cancer Linkage Consortium. Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1023-1028
177. Scott-Conner C.E., Jochimsen P.R., Menck HR.: An analysis of male and female breast cancer treatment and survival among demographically identical pairs of patients. *Surgery* 1999; 126: 775–780.
178. Scully R., Anderson S.F., Chao D.M., Wei W., Ye L., Young R.A., Livingston D.M. and Parvin J.D.: BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997a; 94: 5605-5610.
179. Scully R., Livingston D.M.: In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000; 408: 429-432.
180. Sengupta S. and Roychoudhury S.: DNA Double Strand Break and Repair: Mechanisms and Involvement in Human Cancer. *Int J Hum Genet* 2005; 5: 1-10
181. Seppala E.H., Ikonen T., Mononen N., Autio V., Rokman A., Matikainen M.P., Tammela T.L., Schleutker J.: CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 1966-1970

182. Shattuck-Eidens D., McClure M., Simard J.: A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. Implications for presymptomatic testing and screening. *JAMA* 1995; 273: 535–541.
183. Shattuck-Eidens D., Oliphant A., McClure M.: BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations – risk factor analysis and implications for genetic testing. *JAMA* 1997; 278: 1242–1250.
184. Shelling AN., Cooke IE. and Ganesan TS.: The genetic analysis of ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; 72: 521-527.
185. Siedlecki J.A.: Choroby nowotworowe, w: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej* (red. Bal J), Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2006; 336-348.
186. Smith S.A., DiCioccio R.A., Struwing J.P., Easton D.F., Gallion H.H., Albertsen H., Mazoyer S., Johansson B., Steichen-Gersdorf E., Stratton M., Ford D., Marshall G., White R.L., Piver M.S. and Ponder B.A.J.: Localisation of the breast-ovarian cancer susceptibility gene (BRCA1) on 17q12-21 to an interval of 1 cM. *Genes Chrom Cancer* 1994; 10: 71-76.
187. Smith S.A., Easton D.F., Ford D., Peto J., Anderson K., Averill D., Stratton M., Ponder M., Pye C. and Ponder B.A.J.: Genetic heterogeneity and localization of a familial breast-ovarian cancer gene on chromosome 17q12-q21. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 767-776.
188. Smith T.M., Lee M.K., Szabo C.I., Jerome N., McEuen M., Taylor M., Hood L. and King M-C.: Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 1996; 6: 1029-1049.
189. Sobczak K., Kozłowski P., Napierała M., Czarny J., Wozniak M., Kapuscinska M., Losko M., Koziczak M., Jasinska A., Powierska J., Braczkowski R., Breborowicz J., Godlewski D., Mackiewicz A., Krzyzosiak W.: Novel BRCA1 mutations and more frequent intron-20 alteration found among 236 women from Western Poland. *Oncogene* 1997; 15: 1773-1779.
190. Spurr N.K., Kelsell D.P., Black D.M., Murday V.A., Turner G., Crockford G.P., Solomon E., Cartwright R.A. and Bishop D.T.: Linkage analysis of early-onset breast and ovarian cancer families, with markers on the long arm of chromosome 17. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 777-785.

191. Starita L.M., Parvin J.D.: Substrates of the BRCA1-dependent ubiquitin ligase. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 137–141.
192. Steichen-Gersdorf E., Gallion H.H., Ford D., Girodet C., Easton D.F., DiCioccio R.A., Evans G., Ponder M.A., Pye C., Mazoyer S., Noguchi T., Karengueven F., Sobol H., Hardouin A., Bignon Y-J., Piver M.S., Smith S.A. and Ponder B.A.J.: Familial site-specific ovarian cancer is linked to BRCA1 on 17q12-21. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 870-875.
193. Stempczyńska J., Potemski P.: Nowotwory jajnika, w: *Onkologia - podręcznik dla studentów i lekarzy* (red. Kordek R., Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A.), Wyd. Via Medica, Gdańsk 2004; 164-169.
194. Stoppa-Lyonnet D., Laurent-Puig P., Essioux L.: BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. *Am J Hum Genet* 1997 60: 1021–1030.
195. Stracker T.H., Theunissen J.W., Morales M., Petrini J.H.: The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 845-854. Review.
196. Struewing J.P., Coriaty Z.M., Ron E.: Founder BRCA1/2 mutations among male patients with breast cancer in Israel. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1800-1802.
197. Sverdlov R.S., Barshack I., Bar Sade R.B.: Genetic analyses of male breast cancer in Israel. *Genet Test* 2000; 4: 313-317.
198. Syrjakoski K., Kuukasjarvi T., Auvinen A., Kallioniemi O.P.: CHEK2 1100delC is not a risk factor for male breast cancer population. *Int J Cancer*. 2004; 108: 475-476
199. Szabo C.I., King M.C.: Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; 60: 1013-1020.
200. Tancredi M., Sensi E., Cipollini G., Aretini P., Lombardi G., Di Cristofano C., Presciuttini S., Bevilacqua G., Caligo M.A.: Haplotype analysis of BRCA1 gene reveals a new gene rearrangement: characterization of a 19.9 KB deletion. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12: 775-777.

201. Tavtigian S.V., Simard J., Rommens J., Couch F., Shattuck-Eidens D., Neuhausen S., Merajver S., Thorlacius S., Offit K., Stoppa-Lyonnet D., Belanger C., Bell R., Berry S., Bogden R., Chen Q., Davis T., Dumont M., Frye C., Hattier T., Jammulapati S., Janecki T., Jiang P., Kehrer R., Leblanc J-F., Mitchell J.T., McArthur-Morrison J., Nguyen K., Peng Y., Samson C., Schroeder M., Snyder S.C., Steele L., Stringfellow M., Stroup C., Swedlund B., Swensen J., Teng D., Thomas A., Tran T., Tran T., Tranchant M., Weaver-Feldhaus J., Wong A.K.C., Shizuya H., Eyfjord J.E., Cannon-Albright L., Labrie F., Skolnick M.H., Weber B., Kamb A. and Goldgar D.E.: The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature Genet* 1996; 12: 333-337.
202. Teare M.D., Santibáñez-Koref., Wallace S.A., White G.R.M., Evans D.G.R., Burnell L.D., Harris M., Howell A. and Birch J.M.: A linkage study in seven breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 786-788.
203. Thakur S., Zhang H.B., Peng Y., Le H., Carroll B., Ward T., Yao J., Farid L.M., Couch F.J., Wilson R.B. and Weber B.L.: Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 444-452.
204. Thomas D.B., Jimenez L.M., McTiernan A.: Breast cancer in men: risk factors with hormonal implications. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 734–748.
205. Thomassen M., Gerdes A.M., Cruger D., Jensen P.K., Kruse T.A.: Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in western Denmark. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 168: 168-171.
206. Thompson D., Easton D.: Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 410–419.
207. Thompson L.H., Schild D.: Recombinational DNA repair and human disease *Mutation Research* 2002; 509: 49-78
208. Thorlacius S., Olafsdottir G., Tryggvadottir L.: A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 1996; 13: 117–119.
209. Thorlacius S., Sigurdsson S., Bjarnadottir H., Olafsdottir G., Jonasson J. G., Tryggvadottir L., Tulinius H., Eyfjörd J.E.: Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am j hum genet* 1997; 60: 1079-1084.

210. Tibbetts R.S., Cortez D., Brumbaugh K.M., Scully R., Livingston D., Elledge S.J., Abraham R.T.: Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.* 2000; 14: 2989-3002.
211. Tikhomirova L., Sinicka O., Smite D., Eglitis J., Hodgson S.V., Stengrevics A.: High prevalence of two BRCA1 mutations, 4154delA and 5382insC, in Latvia. *Fam Cancer* 2005; 4: 77-84.
212. Ting N.S., Lee W.H.: The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst).* 2004; 3: 935-944. Review.
213. Tong L., de Vos A.M., Milburn M.V., Jancarik J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Ohtsuka E. and Kim S.H.: Structural differences between a ras oncogene protein and the normal protein. *Nature* 1989; 337: 90-93.
214. Tonin P., Weber B., Offit K., Couch F., Rebbeck T.R., Neuhausen S., Godwin A.K., Daly M., Wagner-Costalos J., Berman D., Grana G., Fox E., Kane M.F., Kolodner R.D., Krainer M., Haber D.A., Struwing J.P., Warner E., Rosen B., Lerman C., Peshkin B., Norton L., Serova O., Foulkes W.D., Lynch H.T., Lenoir G.M., Narod S.A. & Garber J.E.: Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med* 1996; 2: 1179 - 1183.
215. Tonin P.N., Mes-Masson A.M., Futreal P.A.: Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1341–1351.
216. van der Looij M., Wysocka B., Brozek I., Jassem J., Limon J., Olah E.: Founder BRCA1 mutations and two novel germline BRCA2 mutations in breast and/or ovarian cancer families from north-eastern Poland. *Hum Mutat* 2000; 15: 480-481.
217. Venkitaraman A.R.: Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002;108: 171-182
218. Verfaillie C.M., Hurley R., Lundell B.I.: Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do Bcr/Abl-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? *Acta Haematol* 1997; 97: 40–52.
219. Wagner T.M., Moslinger R., Zielinski C., Scheiner O. and Breiteneder H.: New Austrian mutation in BRCA1 gene detected in three unrelated HBOC families. *Lancet* 1996; 347: 1263.

220. 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.
221. Wang H., Shao N., Ding Q.M., Cui J-Q., Reddy E.S.P. and Rao V.N.: BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene* 1997; 15: 143-157.
222. Wang Q., Zhang H., Fishel R. and Greene M.I.: BRCA1 and cell signaling, *Oncogene* 2000; 19: 6152 – 6158
223. Wang Y., Cortez D., Yazdi P., Neff N., Elledge S.J., Qin J.: BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 2000; 14: 927-939.
224. Warner E., Foulkes W., Goodwin P.: Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1241–1247.
225. Weinberg R.A.: *The biology of Cancer*, Garland Science Taylor & Francis Group, 2007; 57-118
226. Welcsh P.L., Owens K.N., King M.C.: Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.* 2000; 16: 69-74. Review.
227. Wilson C.A., Payton M.N., Elliott G.S., Buaas F.W., Cajulis E.E., Grosshans D., Ramos L., Reese D.M., Slamon D.J. and Calzone F.J.: Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-D11b. *Oncogene* 1997; 14: 1-16.
228. Witkowski J.M.: Patofizjologia nowotworów, w: *Patofizjologia*, Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Patofizjologii (red. Hoppe A.), Gdańsk 2002; 195-206.
229. Wong A.K., Pero R., Ormonde P.A., Tavtigian S.V., Bartel P.L.: RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31941-31944.

230. Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C., Micklem G., Barfoot R., Hamoudi R., Patel S., Rice C., Biggs P., Hashim Y., Smith A., Connor F., Arason A., Gudmundsson J., Ficenec D., Kelsell D., Ford D., Tonin P., Bishop D.T., Spurr N.K., Ponder B.A.J., Eeles R., Peto J., Devilee P., Cornelisse C., Lynch H., Narod S., Lenoir G., Egilsson V., Barkardottir R.B., Easton D.F., Bentley D.R., Futreal P.A., Ashworth A. and Stratton M.R.: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792.
231. Xia F., Taghian D.G., DeFrank J.S., Zeng Z.C., Willers H., Iliakis G. and Powell S.N.: Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 8644–8649.
232. Xu C-F., Brown M.A., Chambers J.A., Griffiths B., Nicolai H. and Solomon E.: Distinct transcription start sites generate two forms of BRCA1 mRNA. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2259-2264.
233. Yildirim E., Berberoglu U.: Male breast cancer: a 22-year experience. *Eur J Surg Oncol* 1998; 24: 548–552.
234. Zhou B.B., Elledge S.J.: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433–439.
235. Zimmermann W., Bender E., Rohde K., Reis A., Wiseman R., Futreal A., Krause H., Prokoph H., Werner S. and Scherneck S.: Linkage analysis in German breast cancer families with early onset of the disease, using highly polymorphic markers from the chromosome 17q11-q24 region. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 789-791.
236. Zhong Q., Chen C.F., Li S., Chen Y., Wang C.C., Xiao J., Chen P.L., Sharp Z.D., Lee W.H.: Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*. 1999; 285:747-750.
237. Zhong Q., Boyer T.G., Chen P.L., Lee W.H.: Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res*. 2002; 62:3966-3970.

238. Zhong Q., Chen C.F., Chen P.L., Lee W.H.: BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem.* 2002; 277:28641-28647.

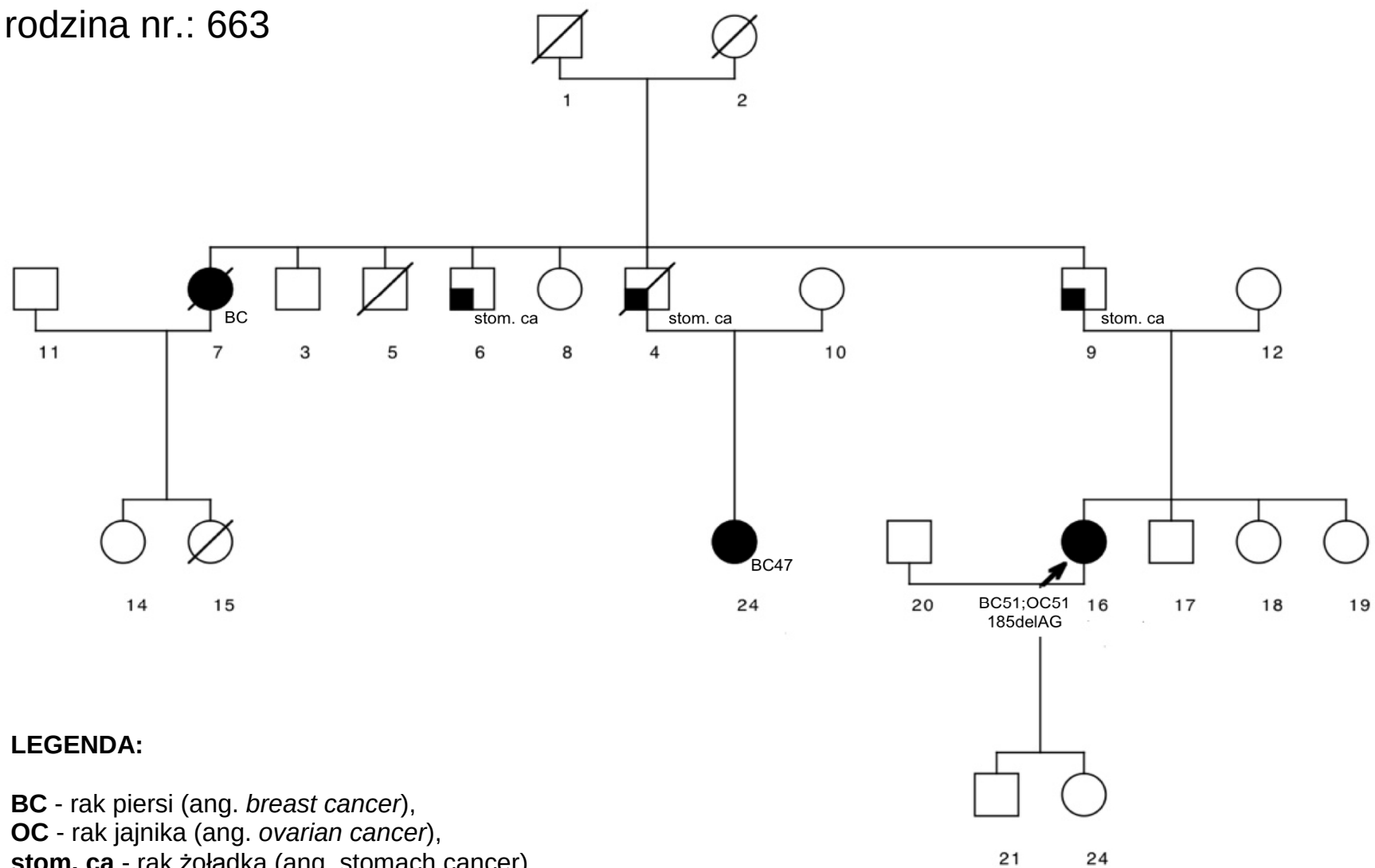
10. ZAŁĄCZNIKI

Rodowody wybranych rodzin w których stwierdzono obecność mutacji w genie *BRCA1/2*

Schemat genu *BRCA1*

Schemat genu *BRCA2*

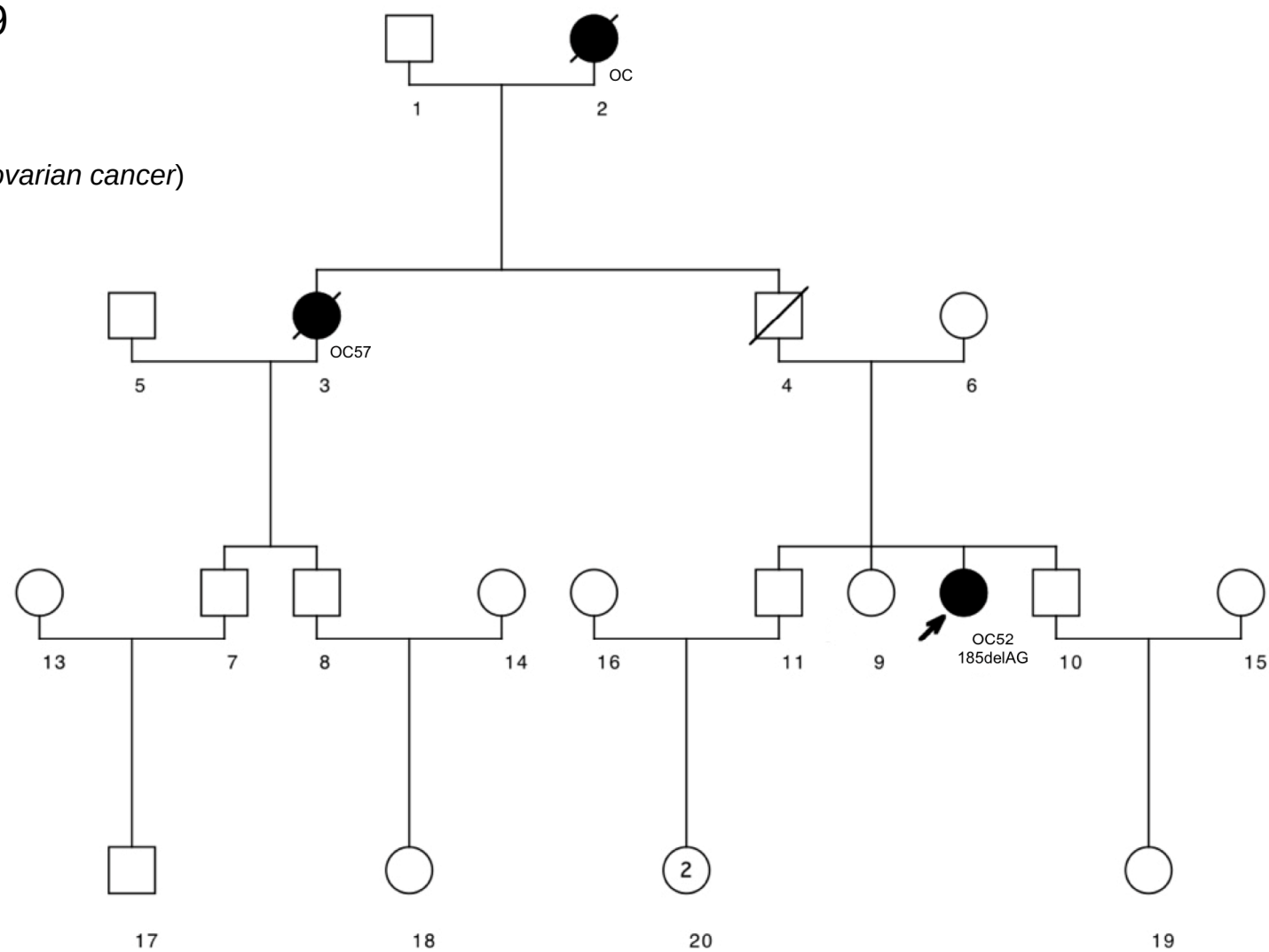
rodzina nr.: 663



rodzina nr.: 779

LEGENDA:

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*)



rodzina nr.: 681/1067

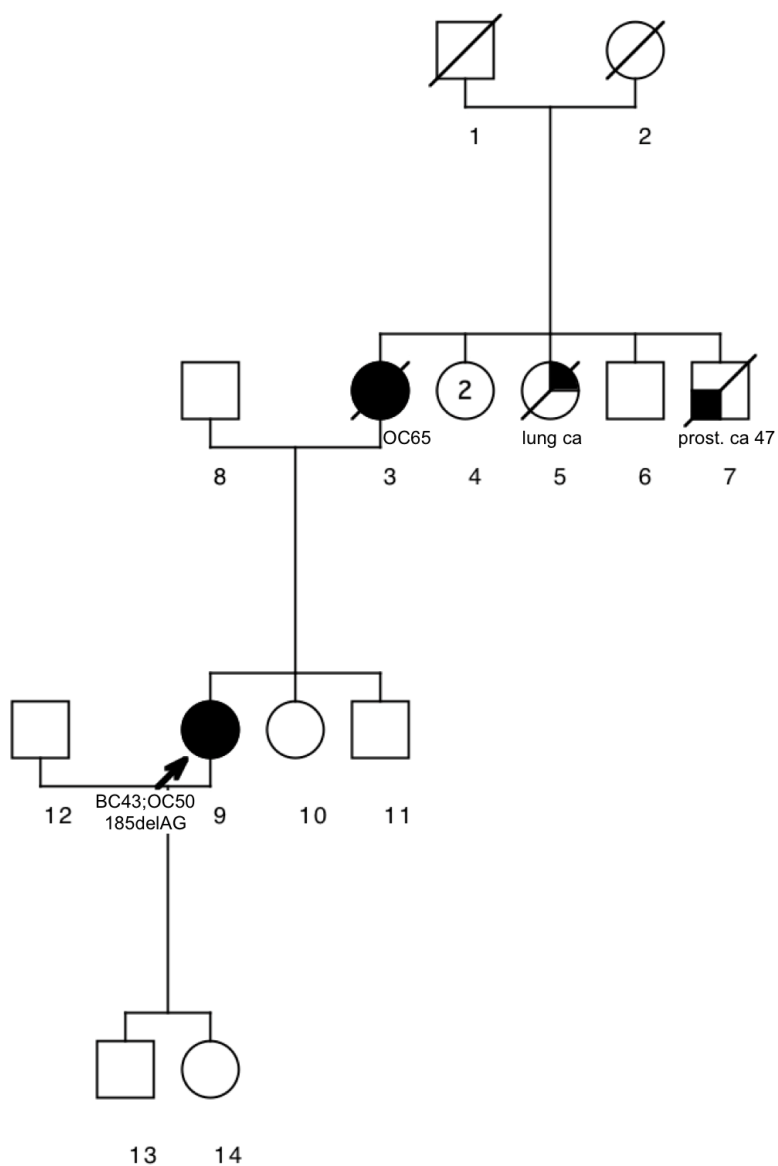
LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

lung ca - rak płuca (ang. *lung cancer*),

prost. ca - rak prostaty (ang. *prostate cancer*)

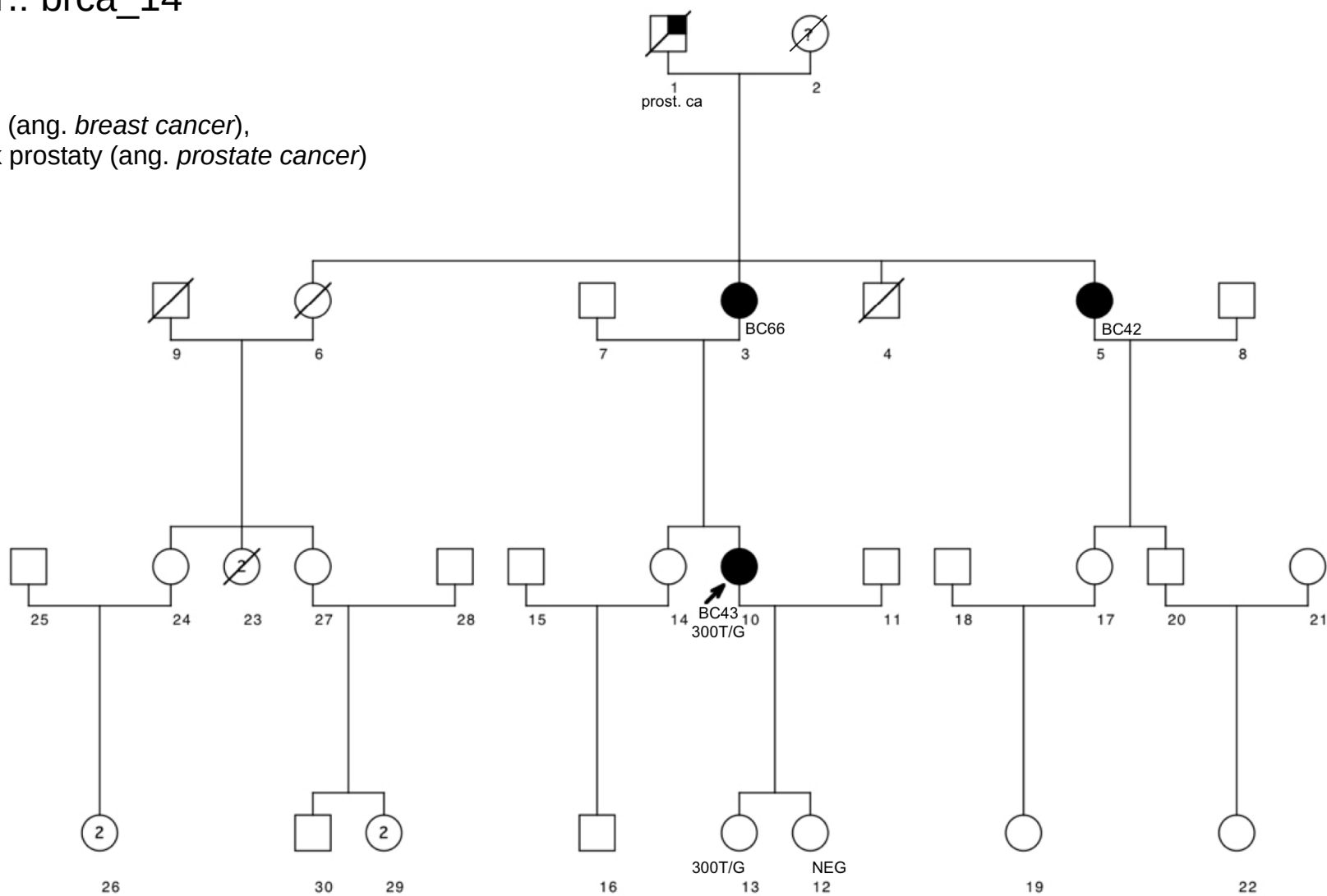


rodzina nr.: brca_14

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

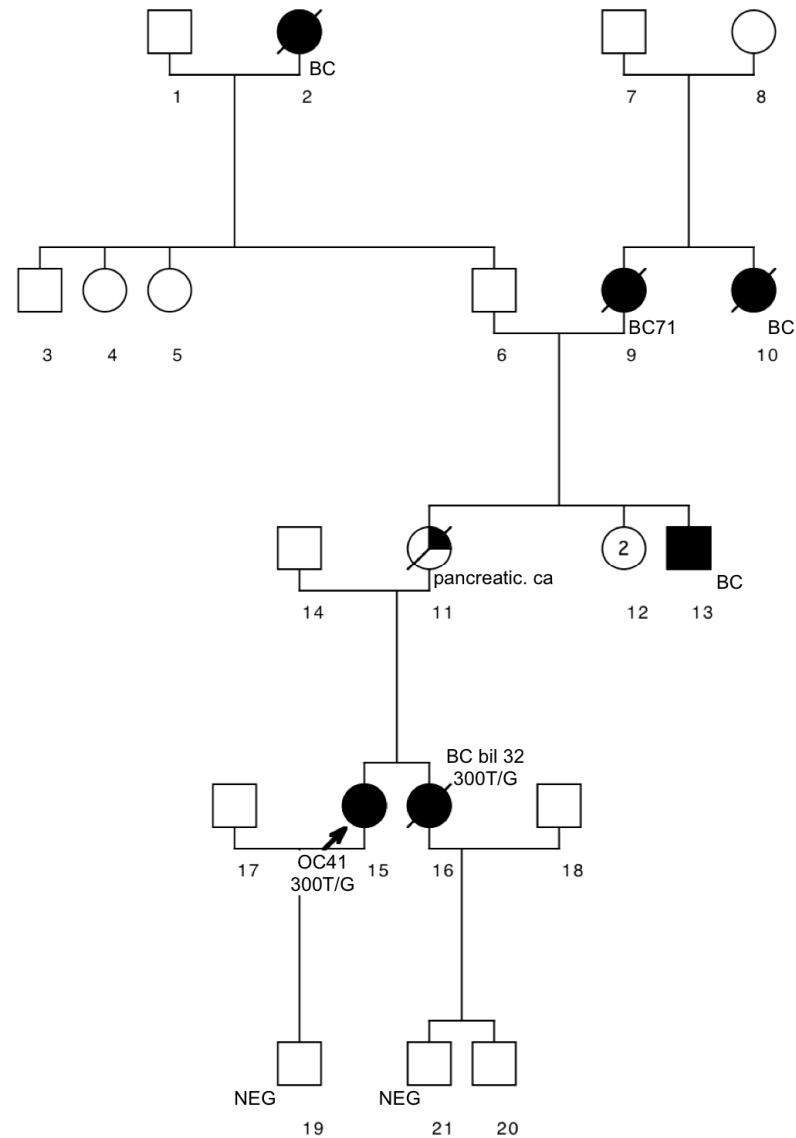
prost. ca - rak prostaty (ang. *prostate cancer*)



rodzina nr.: brca_49

LEGENDA:

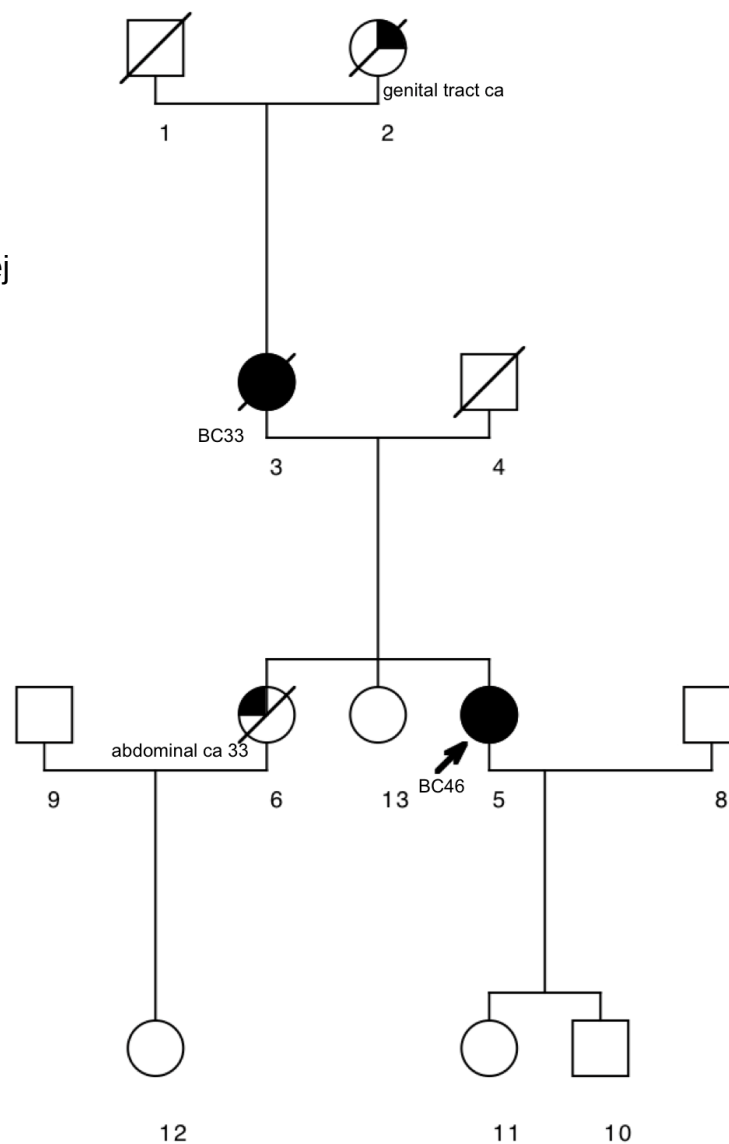
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
BC bil - obustronny rak piersi,
(ang. *bilateral breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
pancreatic ca - rak trzustki



rodzina nr.: brca_54

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych,
abdominal ca - nowotwór w jamie brzusznej



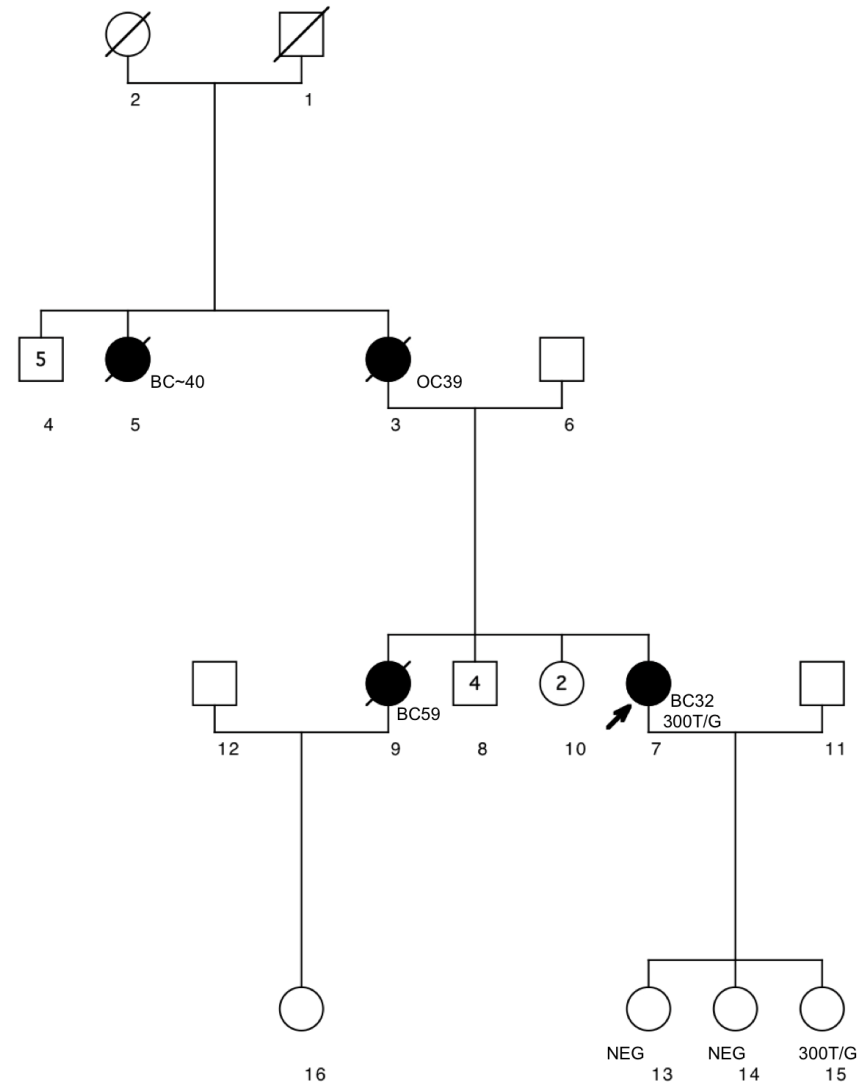
rodzina nr.: 671

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

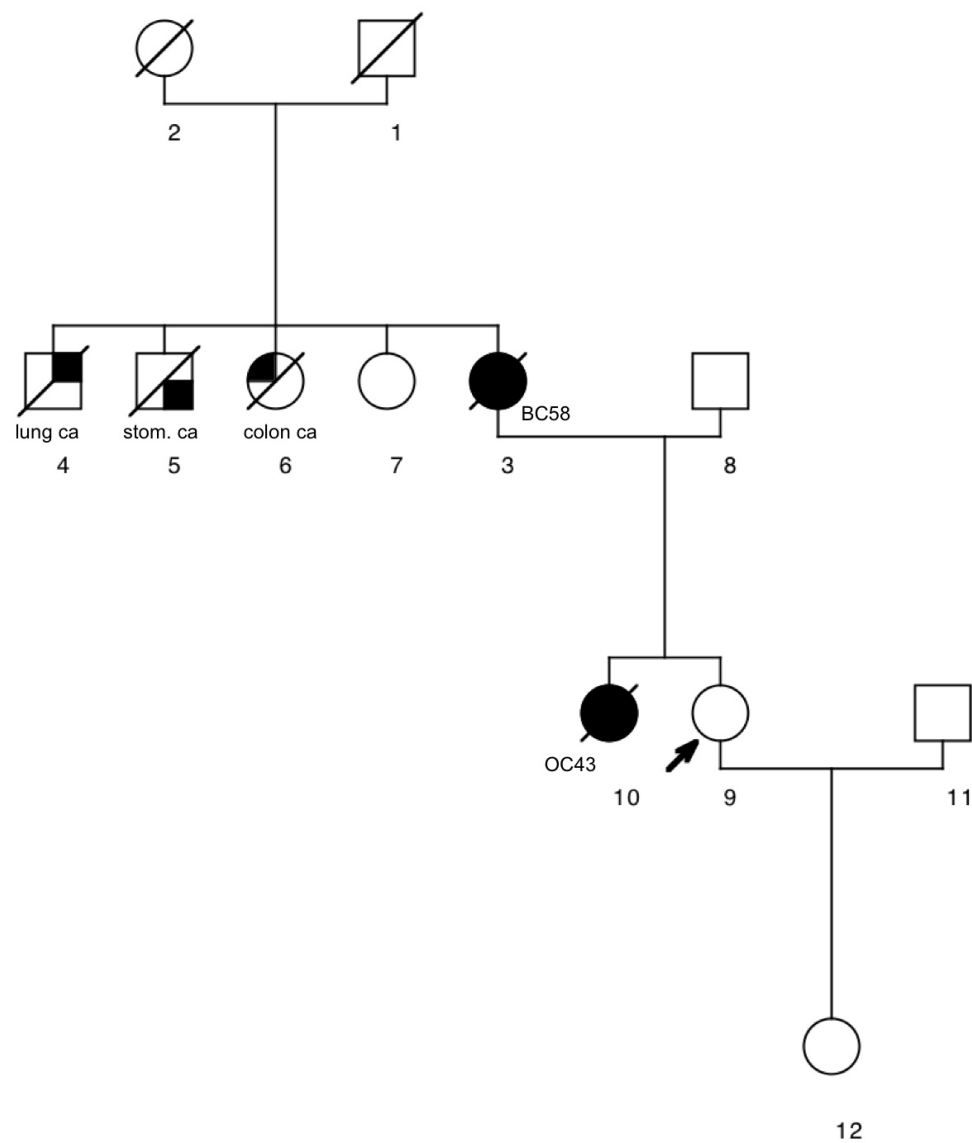
NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym, wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 696

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
lung ca - rak płuca (ang. *lung cancer*),
stom. ca - rak żołądka (ang. *stomach cancer*),
colon ca - rak jelita (ang. *colon cancer*)

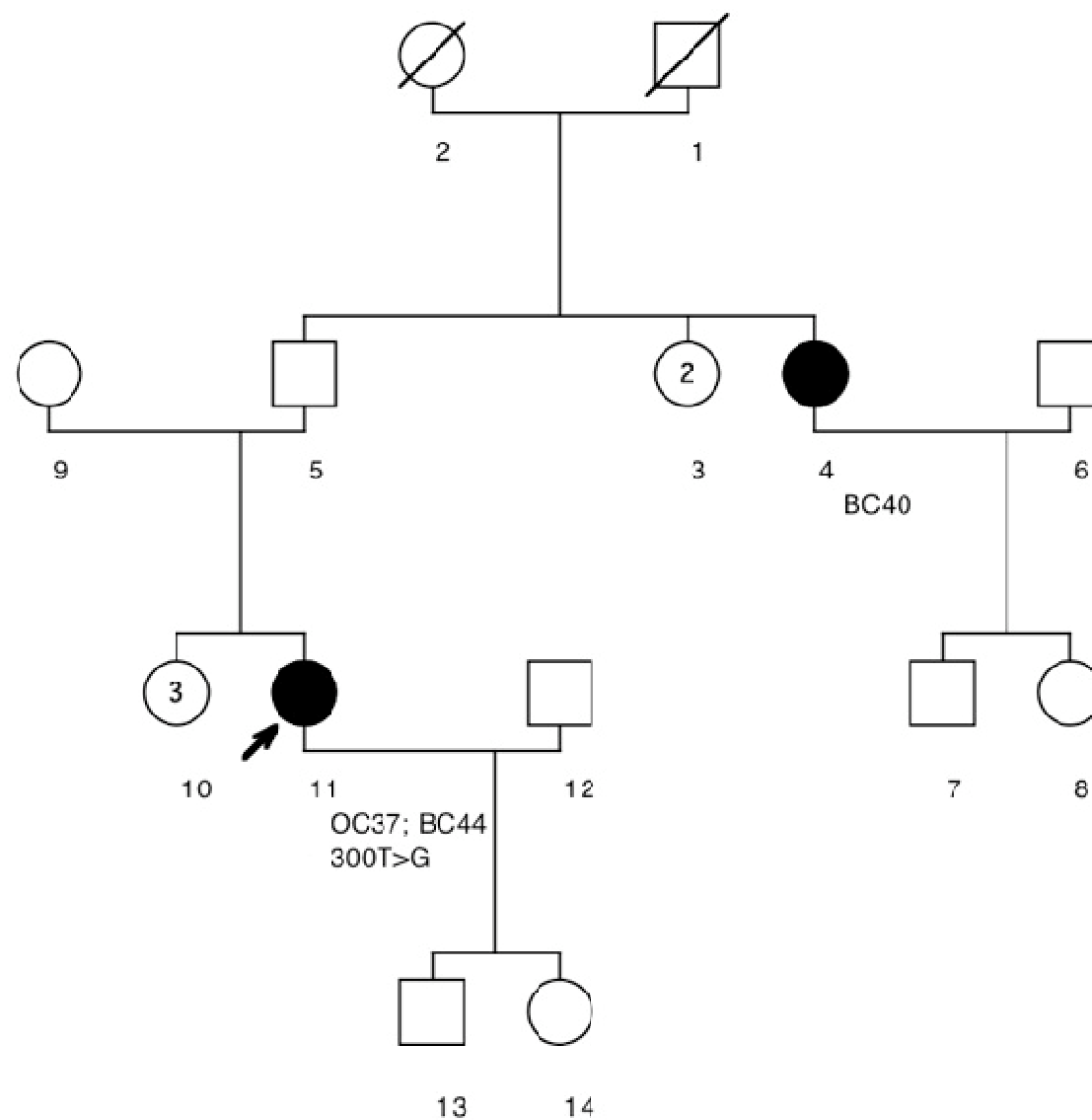


rodzina nr.: 906

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*)



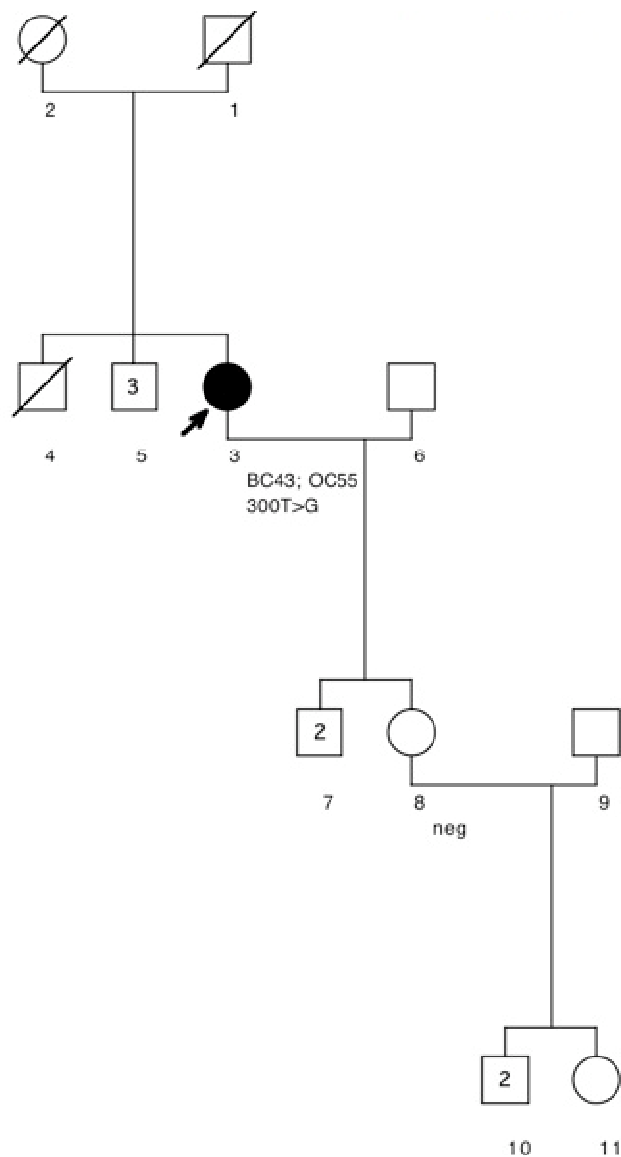
rodzina nr.: 1017

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym, wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 1058

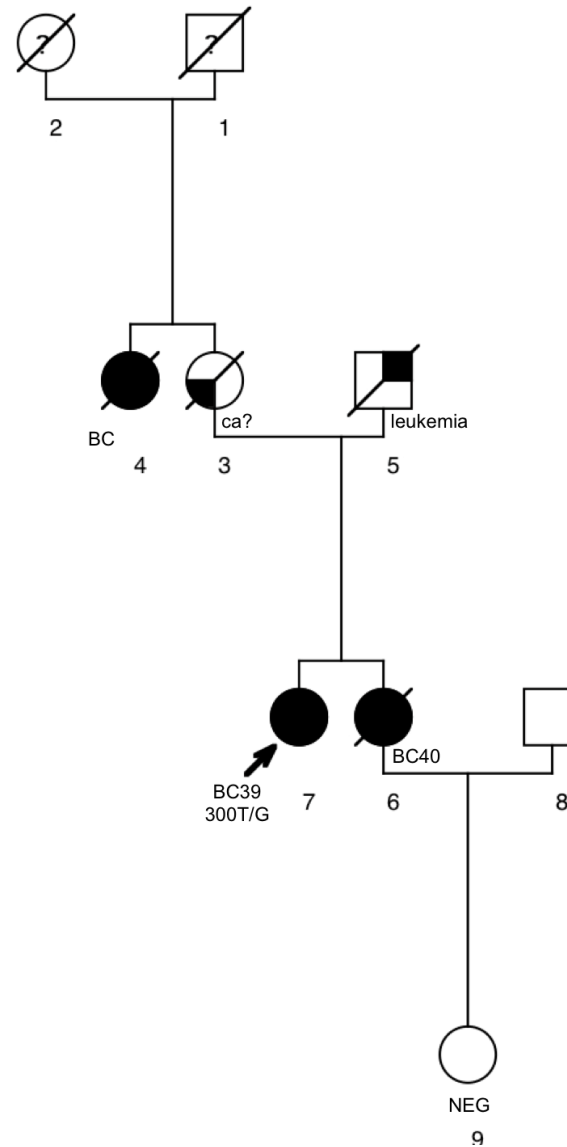
LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

leukemia - białaczka,

ca? - prawdopodobnie nowotwór,

NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym,
wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 1267

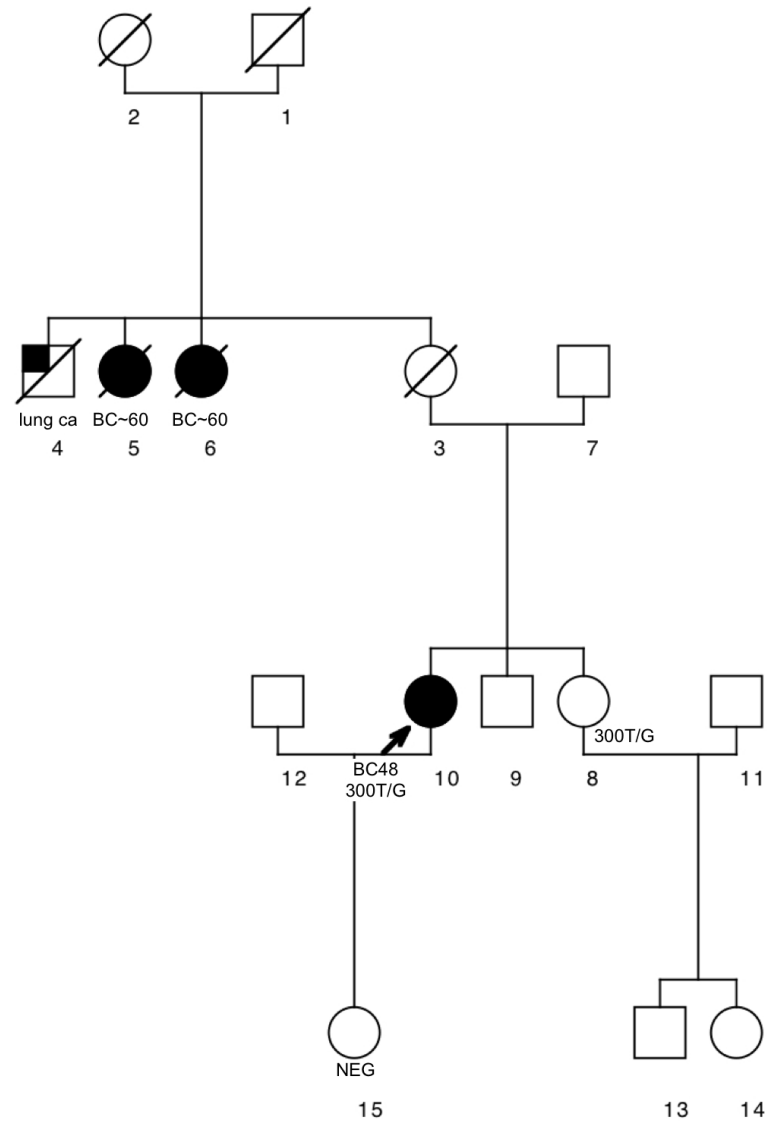
LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

lung ca - rak płuca (ang. *lung cancer*),

NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym, wykluczono występowanie mutacji



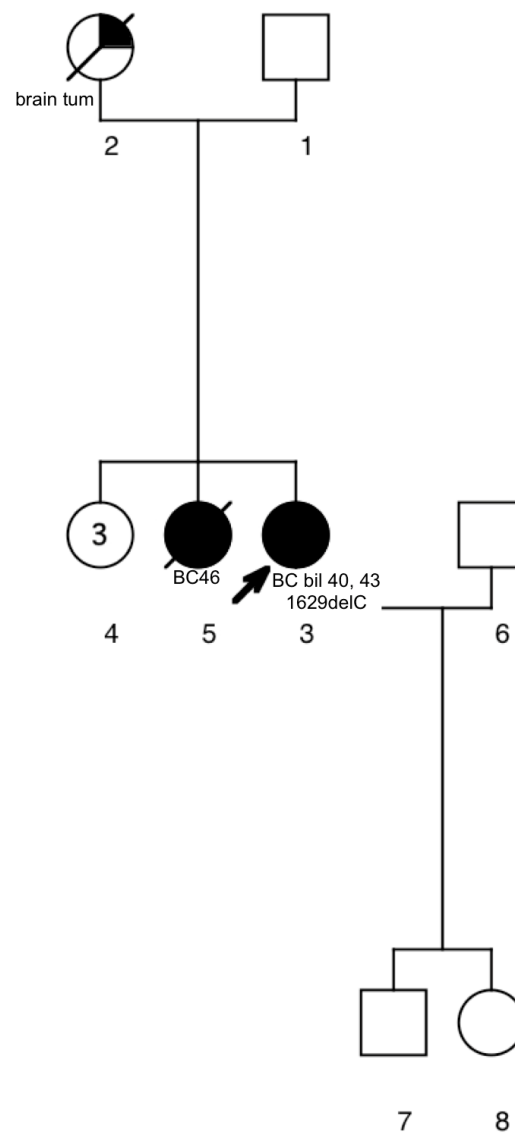
rodzina nr.: 838

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

BC bil - obustronny rak piersi
(ang. *bilateral breast cancer*),

brain tum. - guz mózgu (ang. *brain tumour*)



rodzina nr.: brca_6

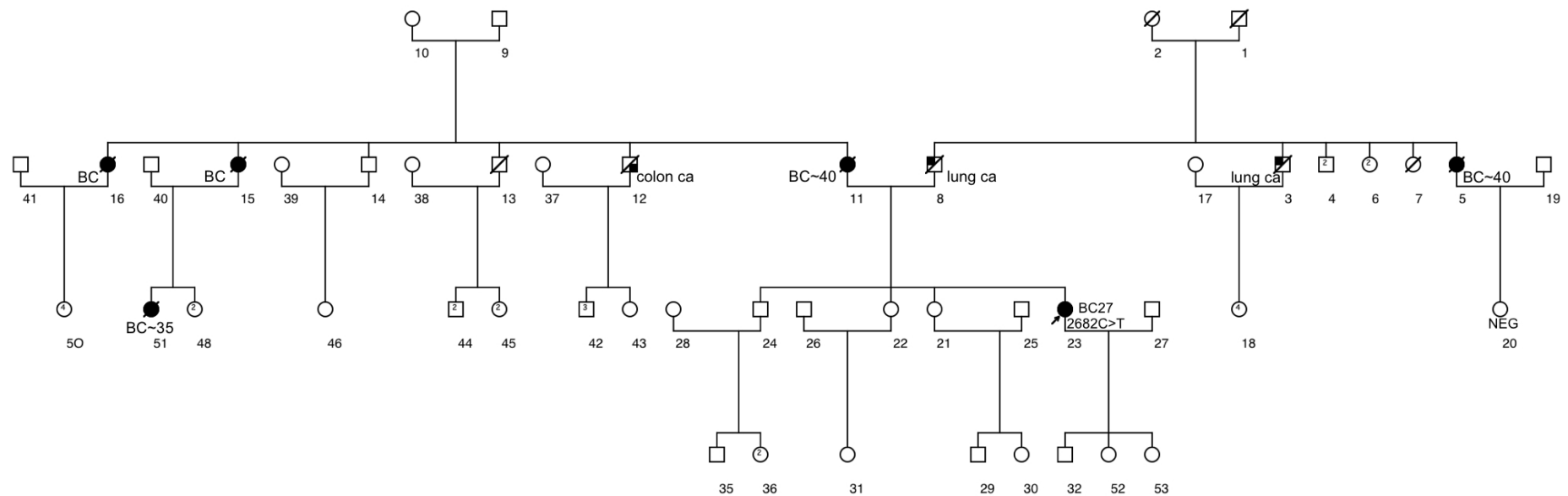
LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

lung ca - rak płuca (ang. *lung cancer*),

colon ca - rak jelita (ang. *colon cancer*)

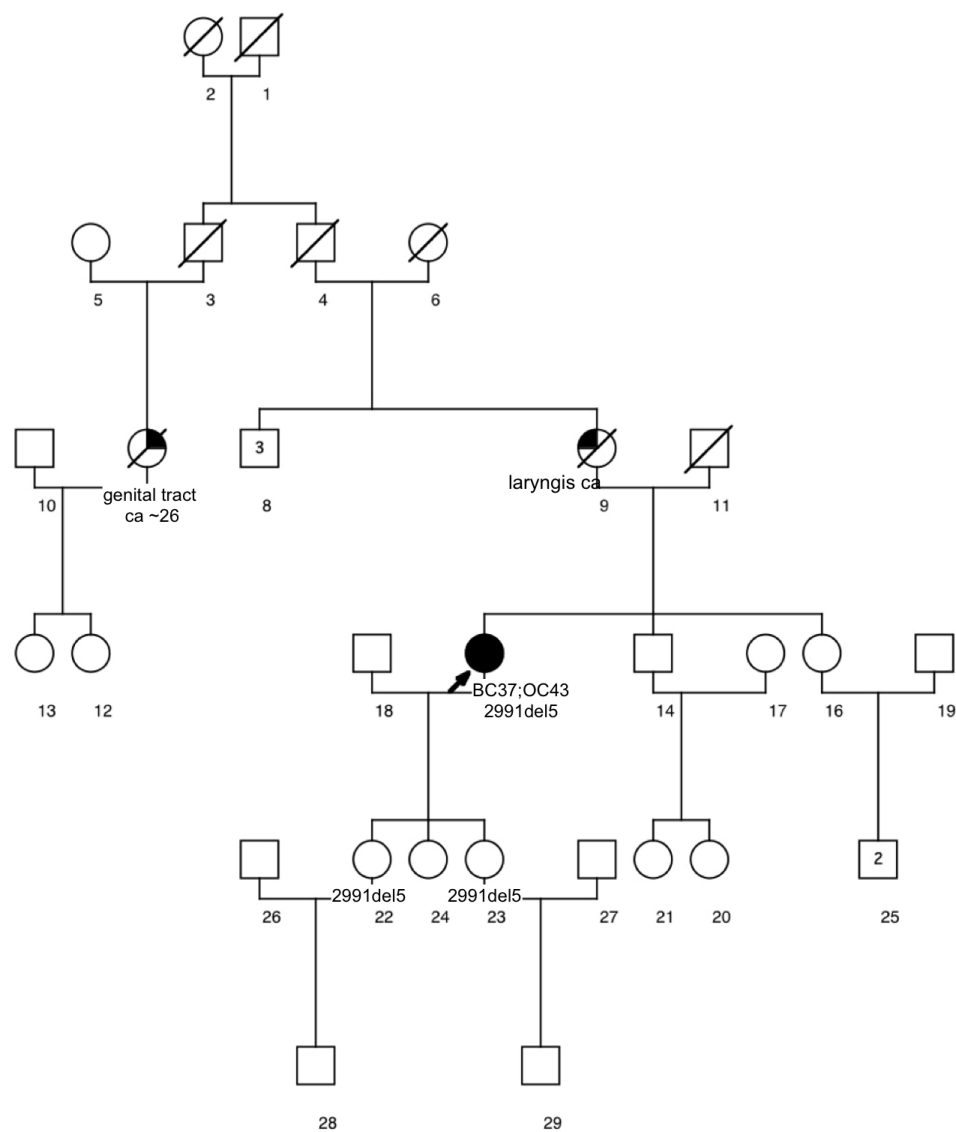
NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym, wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 1064

LEGENDA:

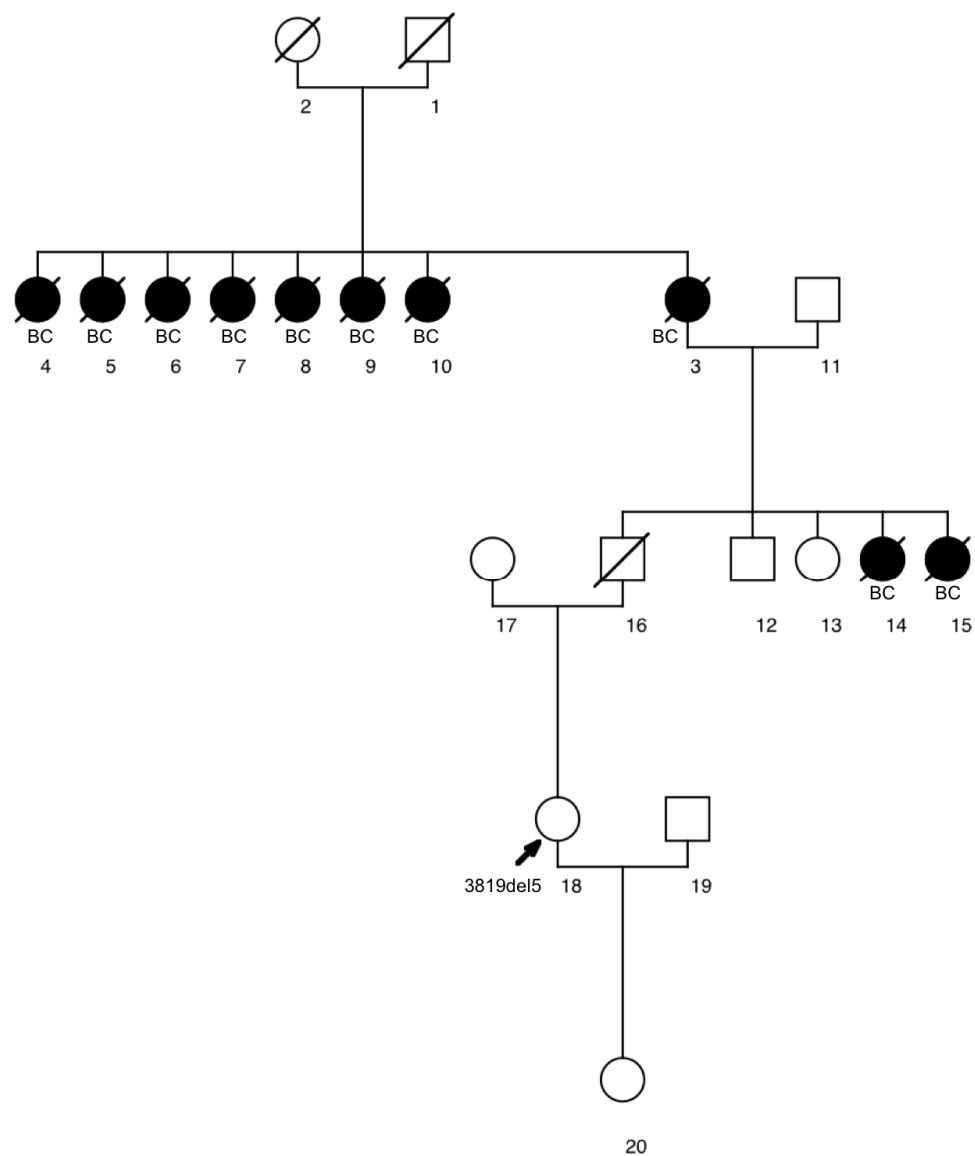
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
laryngis ca - rak krtani,
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych



rodzina nr.: 705

LEGENDA:

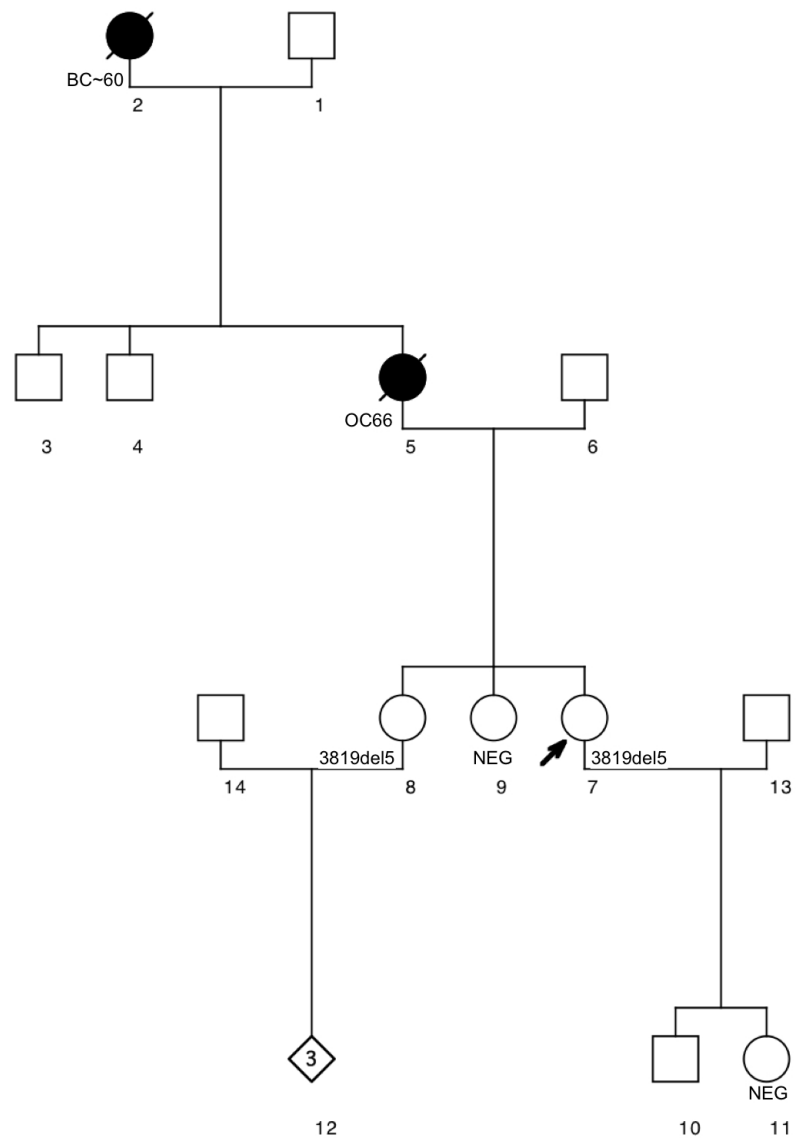
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: 1150

LEGENDA:

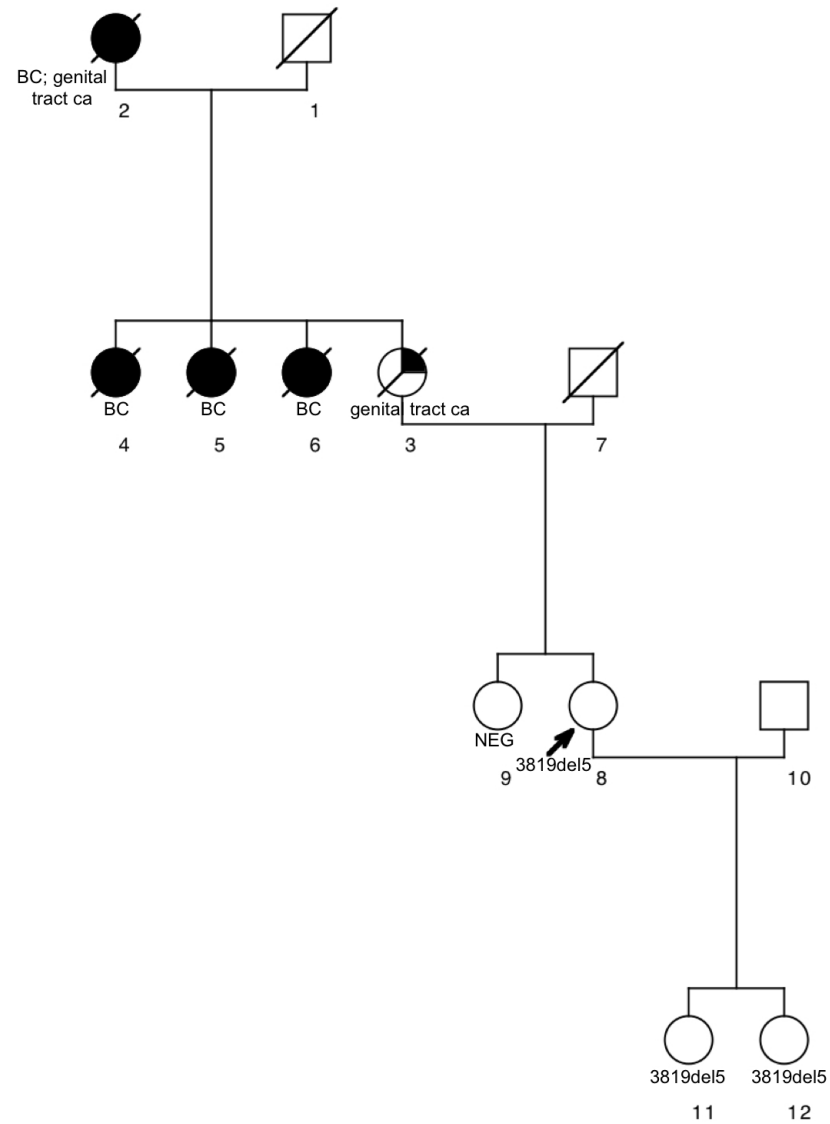
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*)



rodzina nr.: 1262

LEGENDA:

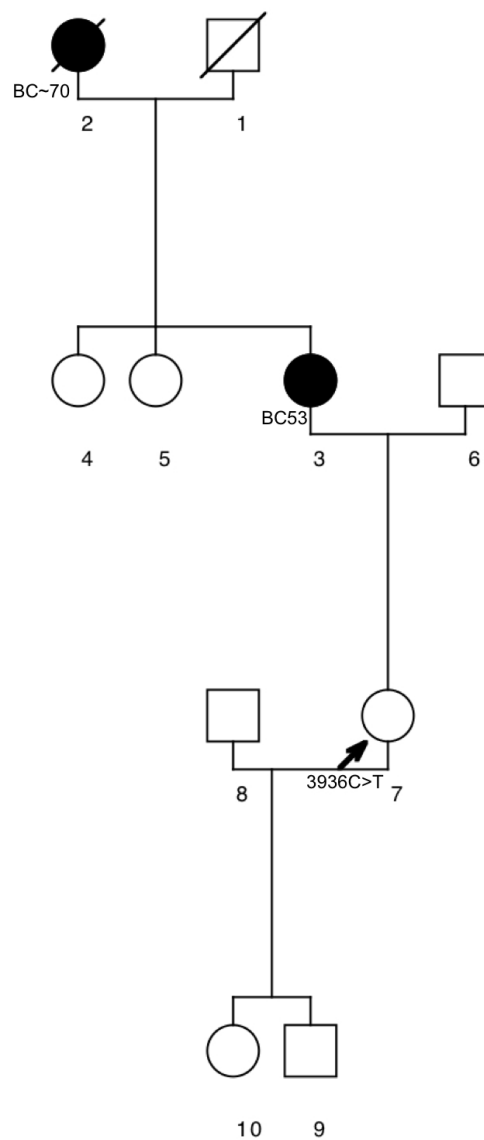
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych,
NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym,
wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: brca_26

LEGENDA:

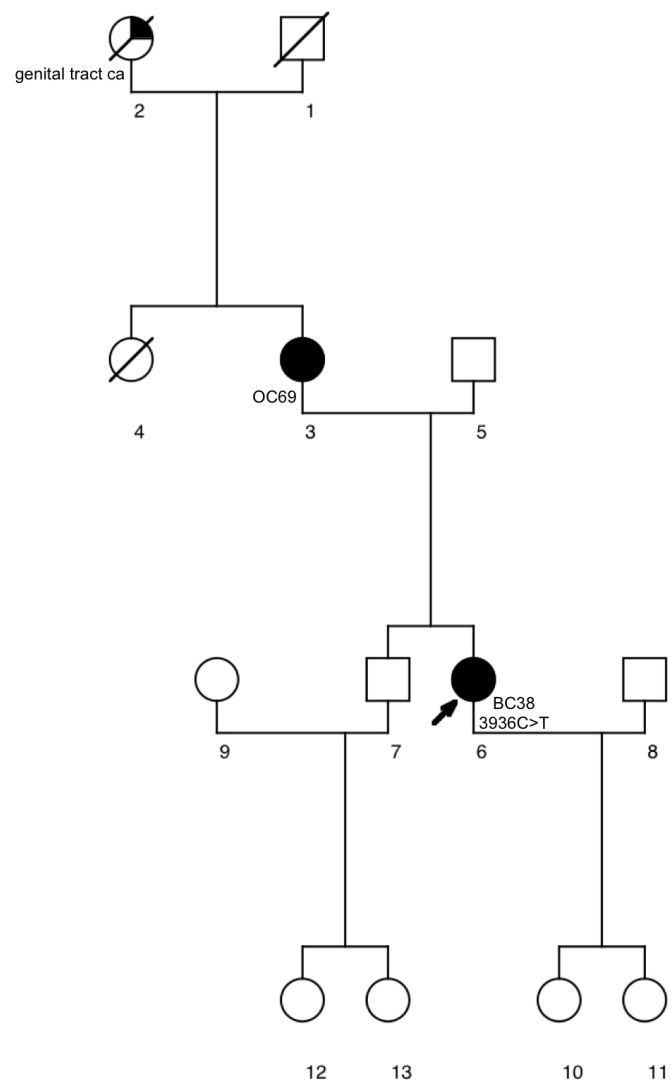
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: 841

LEGENDA:

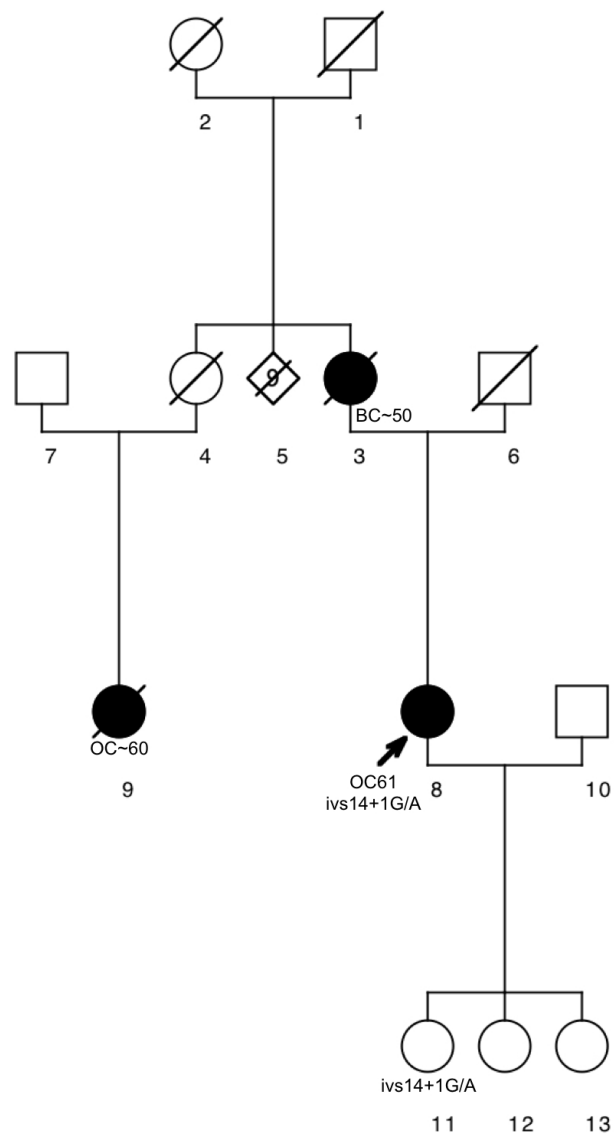
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych



rodzina nr.: brca_3

LEGENDA:

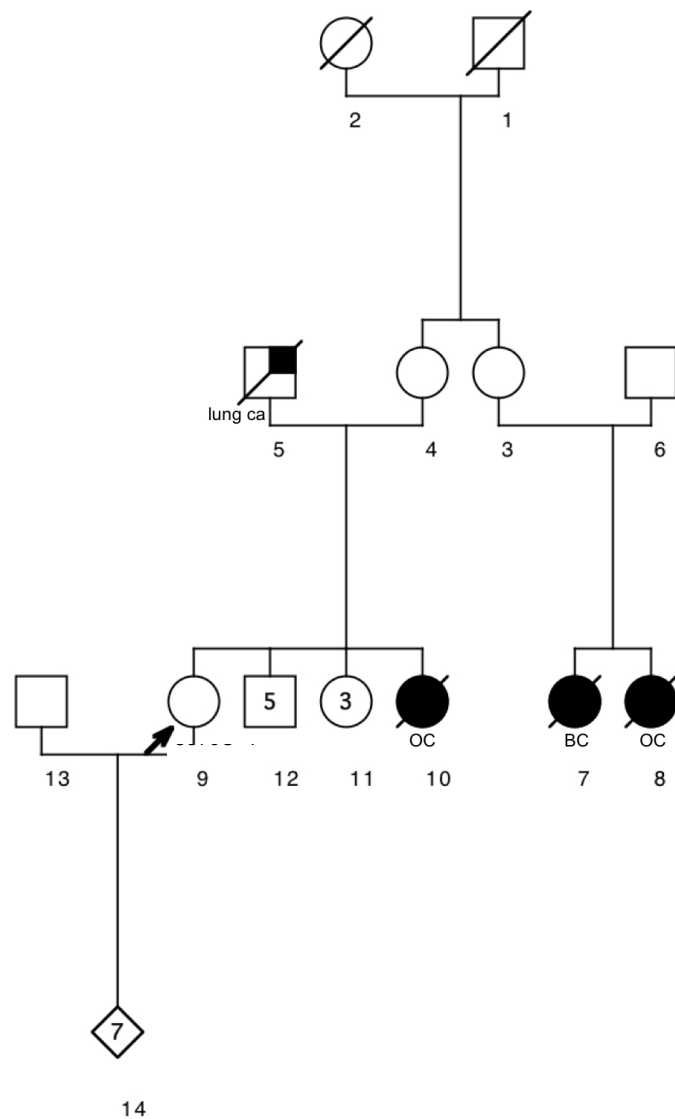
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*)



rodzina nr.: 1871/1923

LEGENDA:

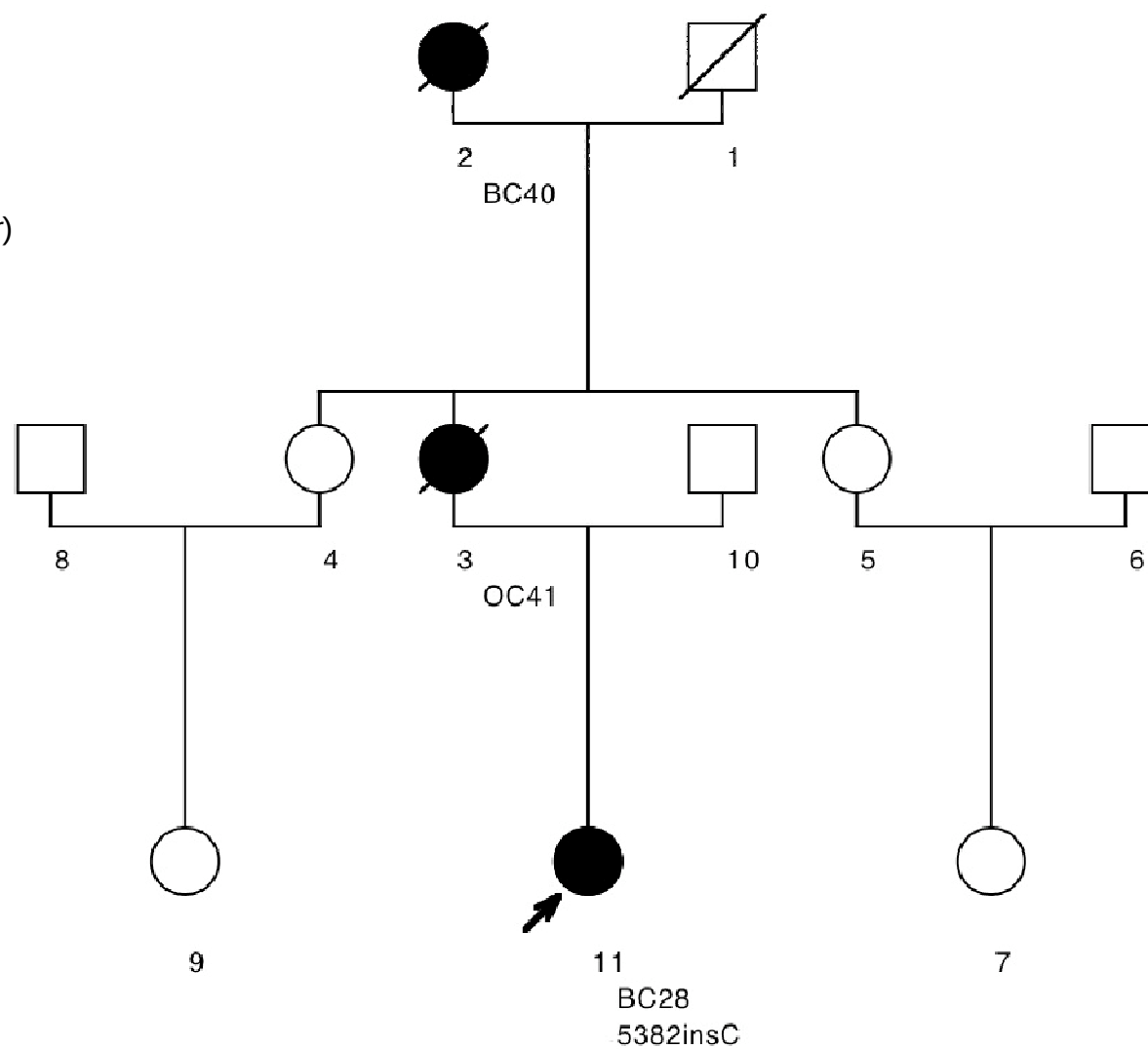
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
lung ca - rak płuca (ang. *lung cancer*)



rodzina nr.: brca_10

LEGENDA:

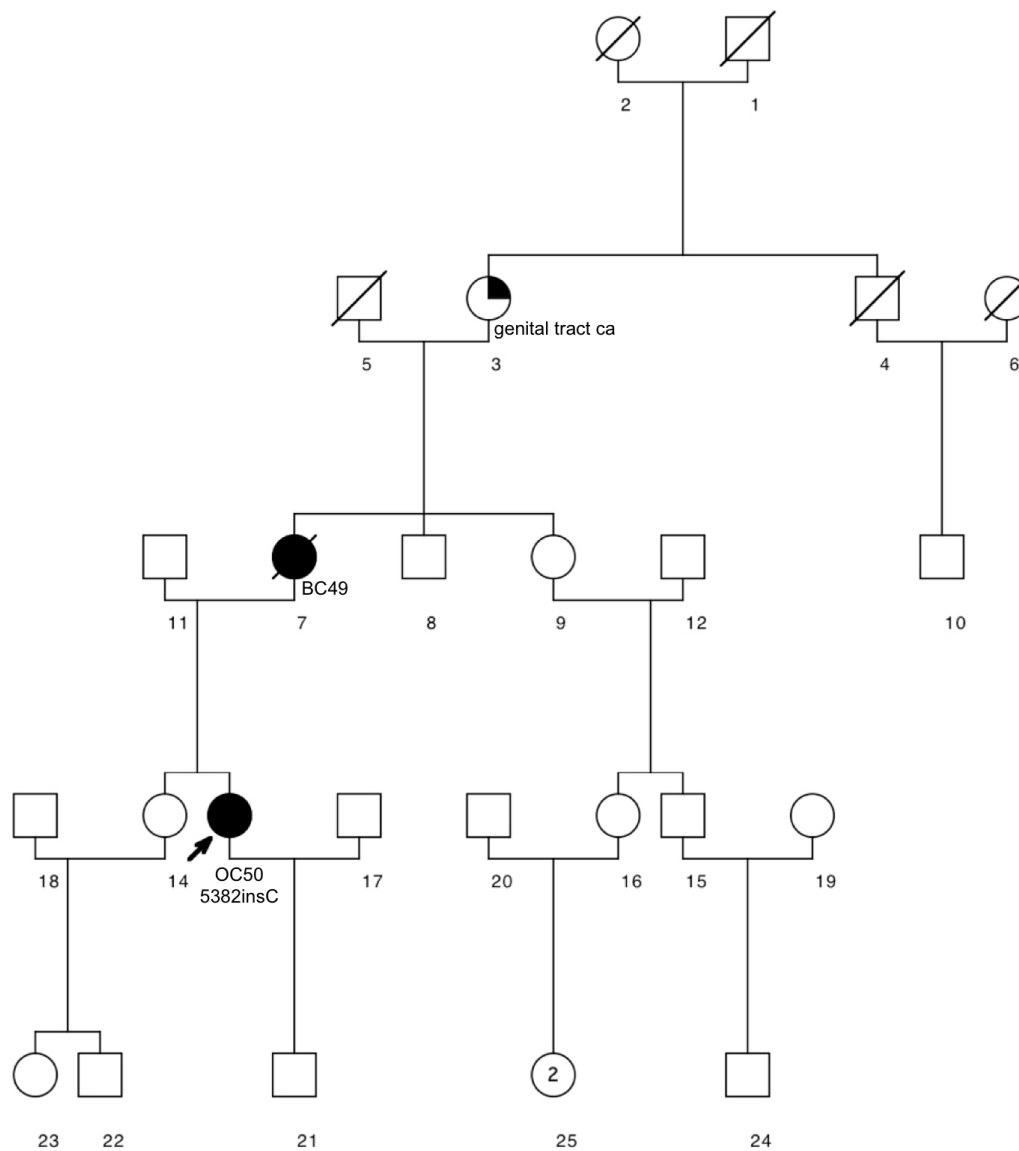
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*)



rodzina nr.: brca_19

LEGENDA:

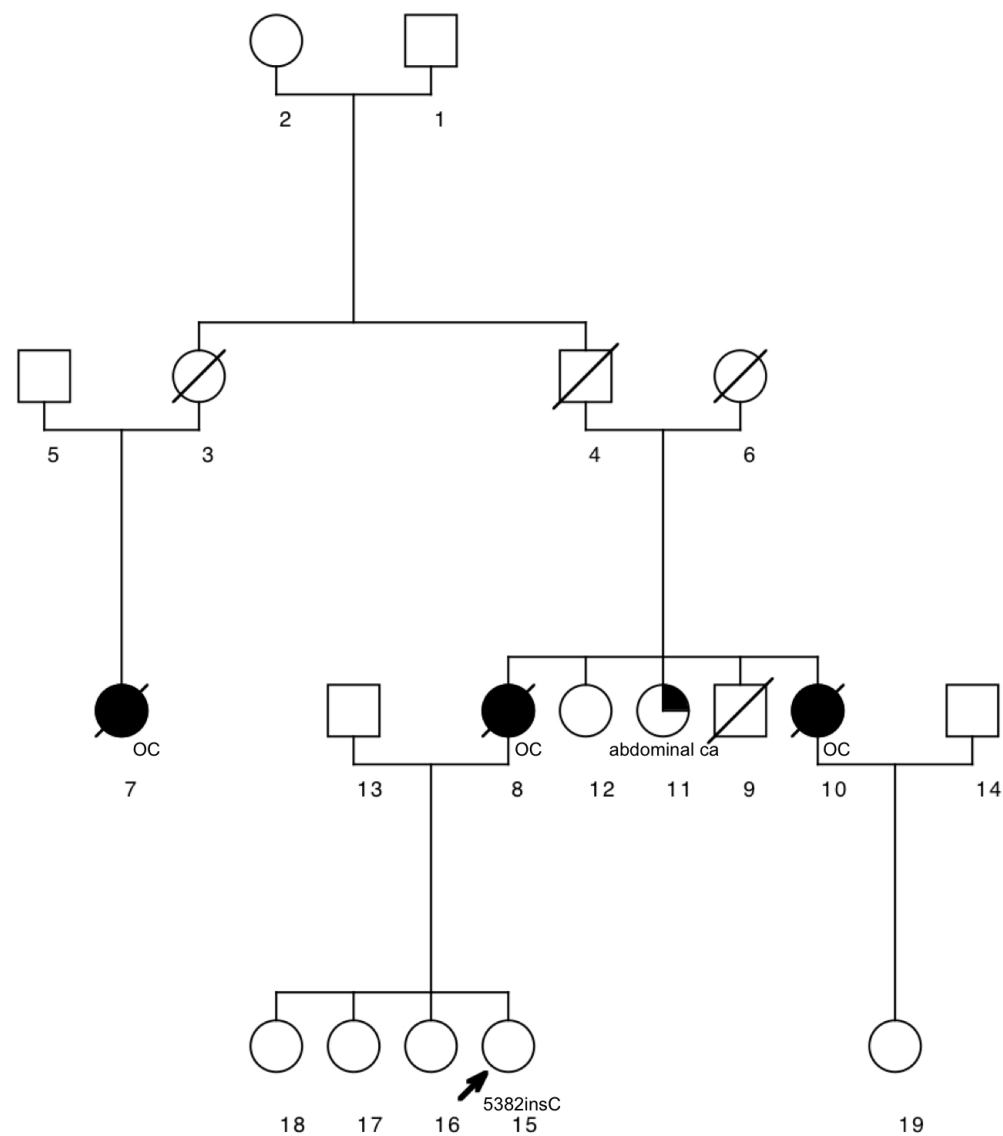
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych



rodzina nr.: brca_22

LEGENDA:

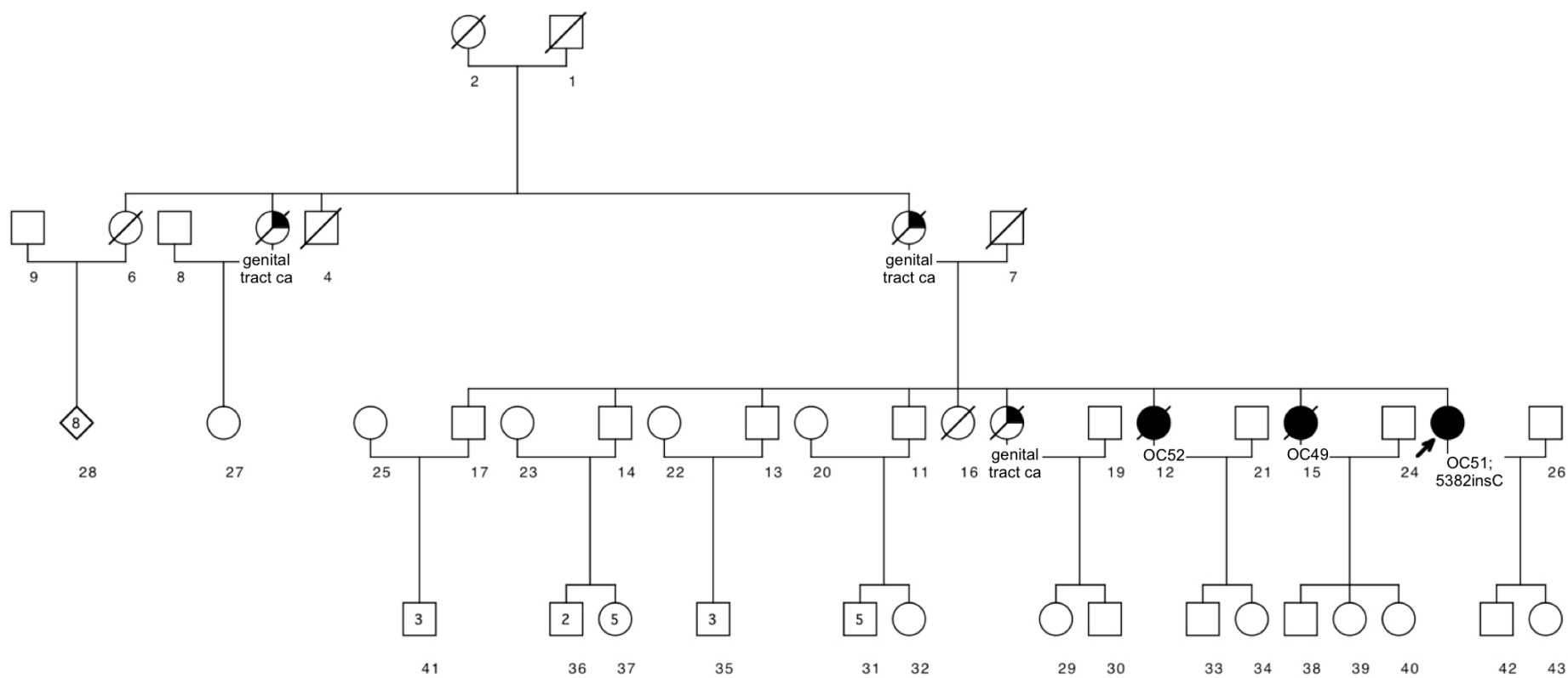
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
abdominal ca - nowotwór w jamie brzusznej



rodzina nr.: brca_39

LEGENDA:

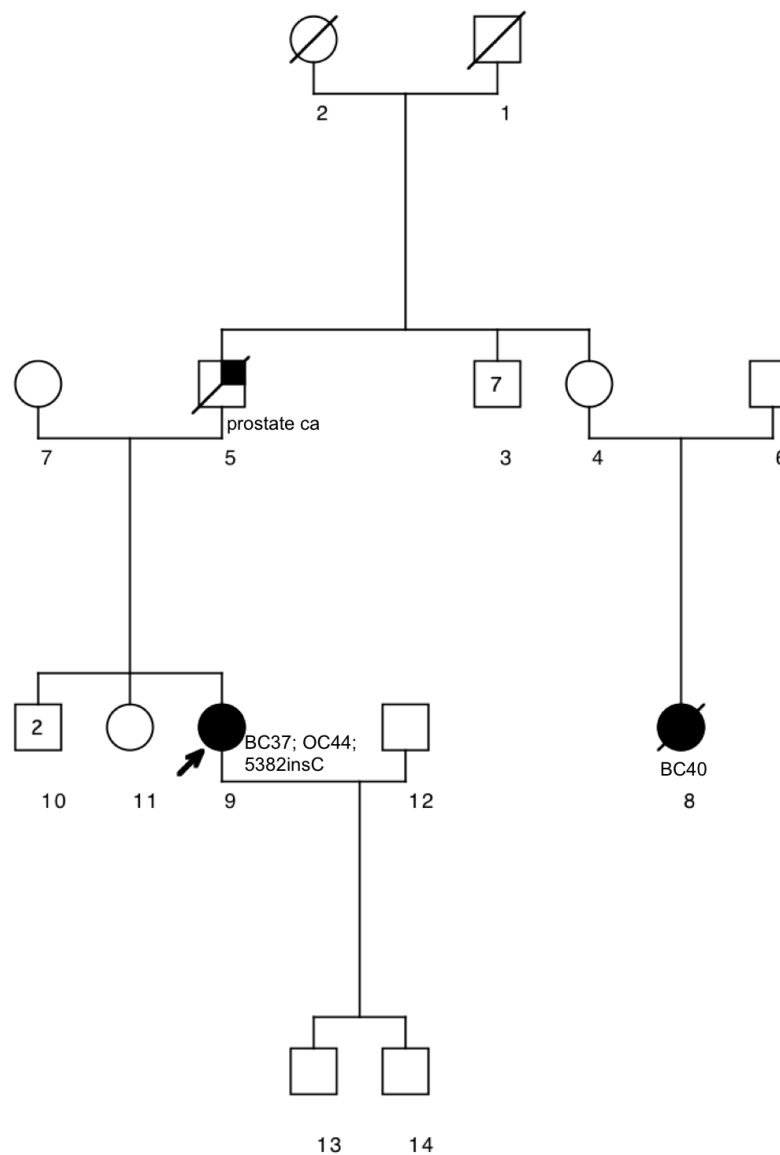
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych



rodzina nr.: brca_43

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
prost. ca - rak prostaty (ang. *prostate cancer*)



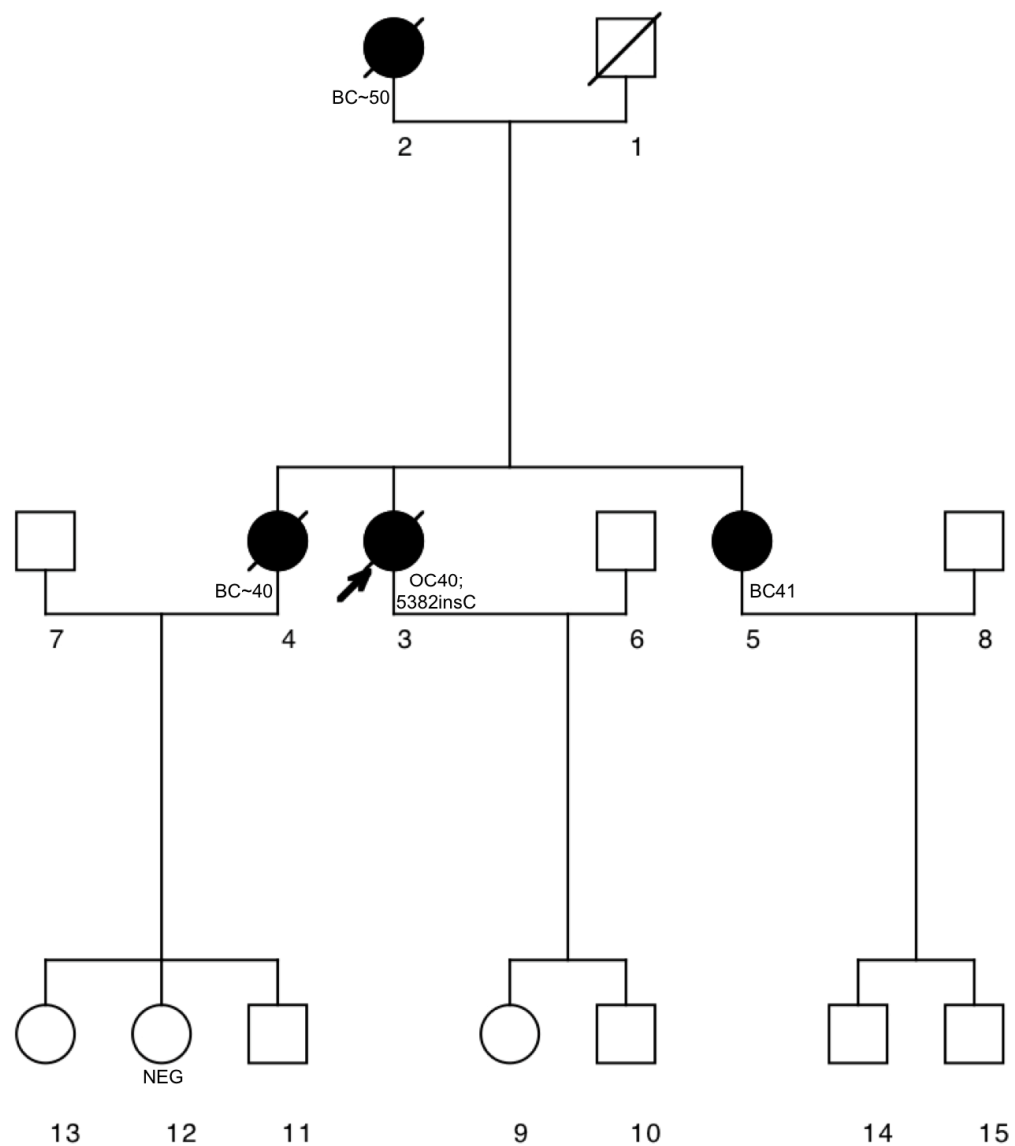
rodzina nr.: brca_46

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

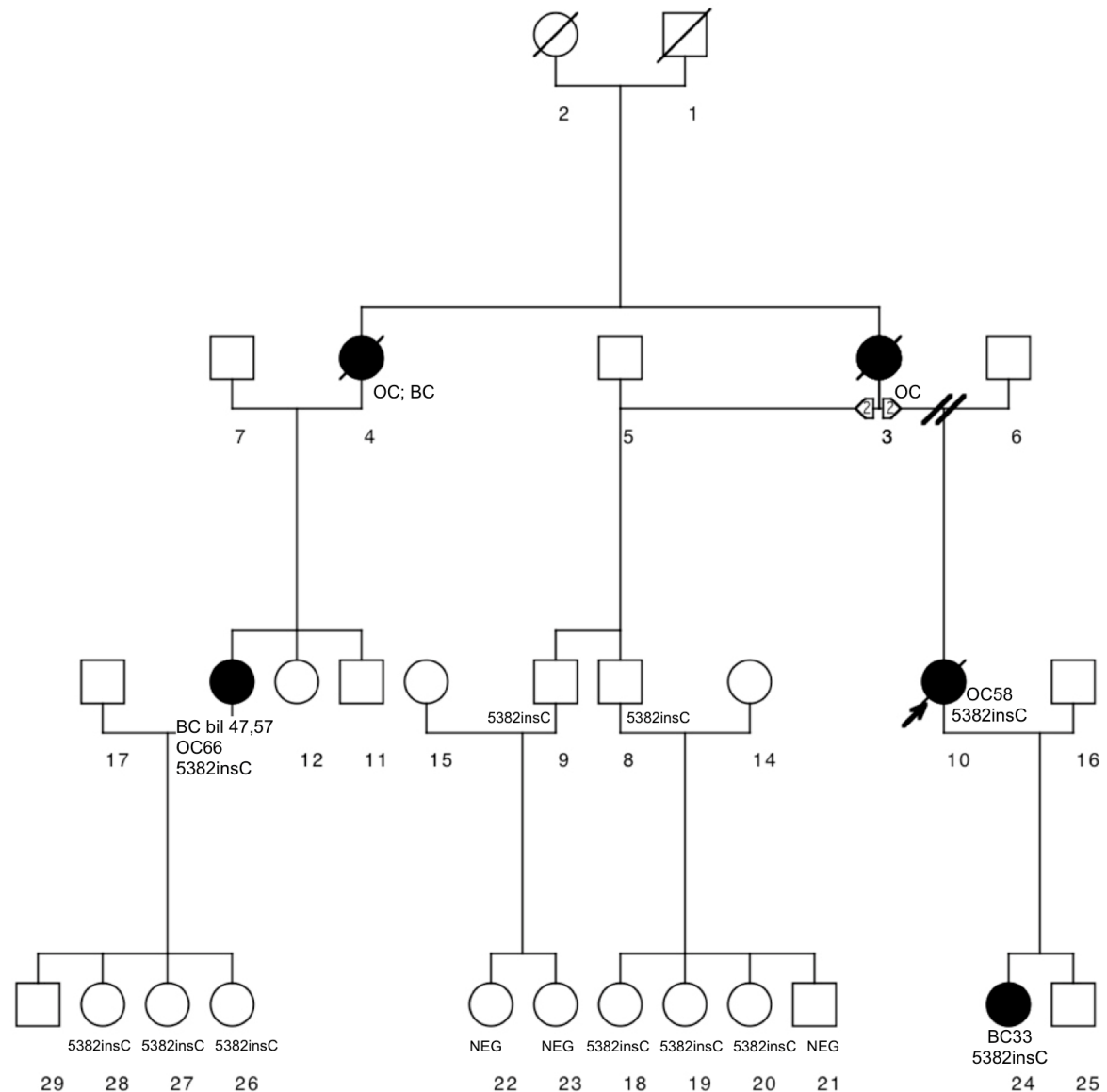
NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym,
wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 718

LEGENDA:

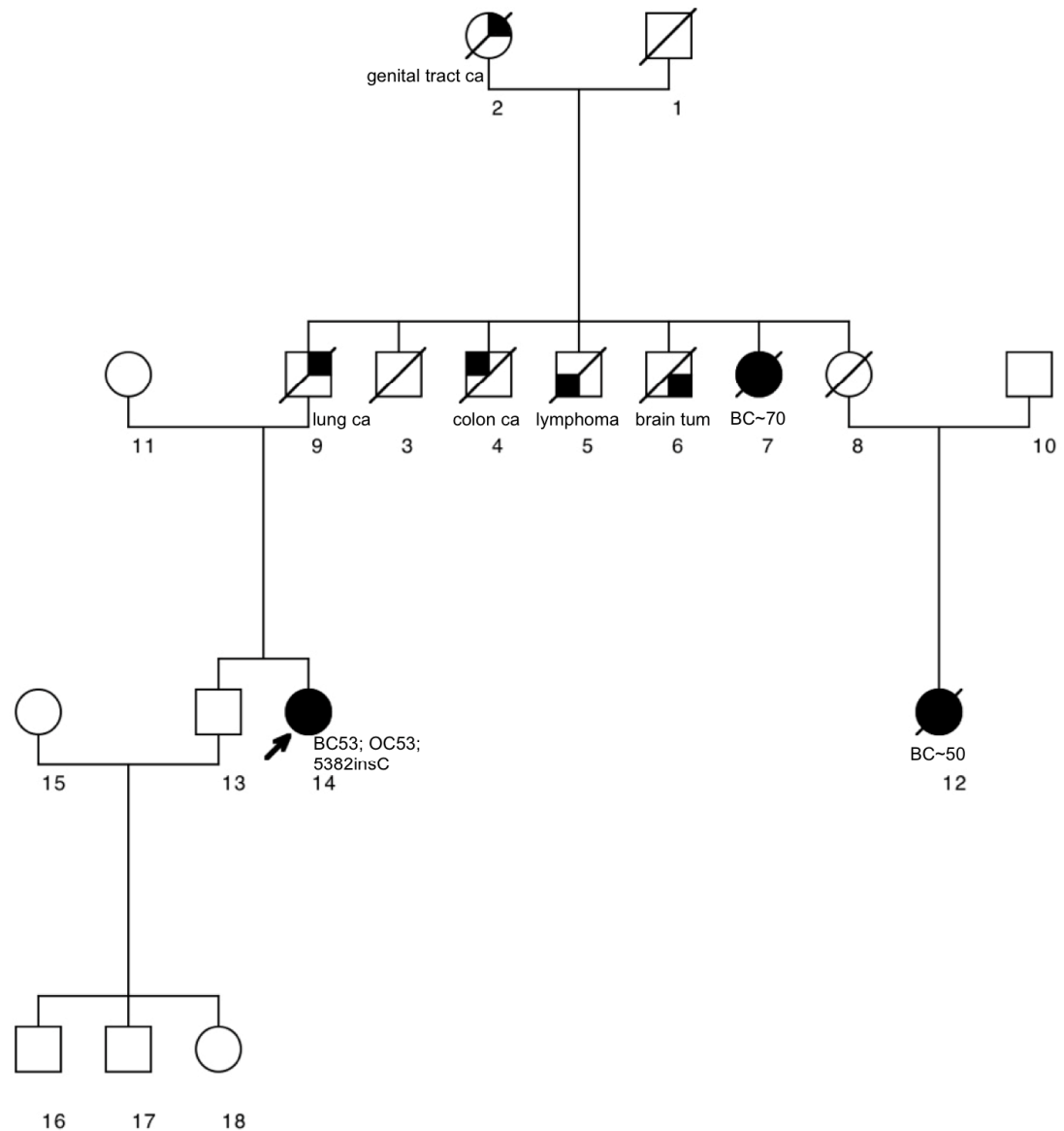
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
BC bil - obustronny rak piersi
(ang. *bilateral breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
NEG- osoby u których, w badaniu
kosegregacyjnym, wykluczono
występowanie
mutacji



rodzina nr.: 723

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych,
lung ca - rak płuca (ang. *lung cancer*),
colon ca - rak jelita (ang. *colon cancer*),
lymphoma - chłoniak,
brain tum. - guz mózgu (ang. *brain tumour*)



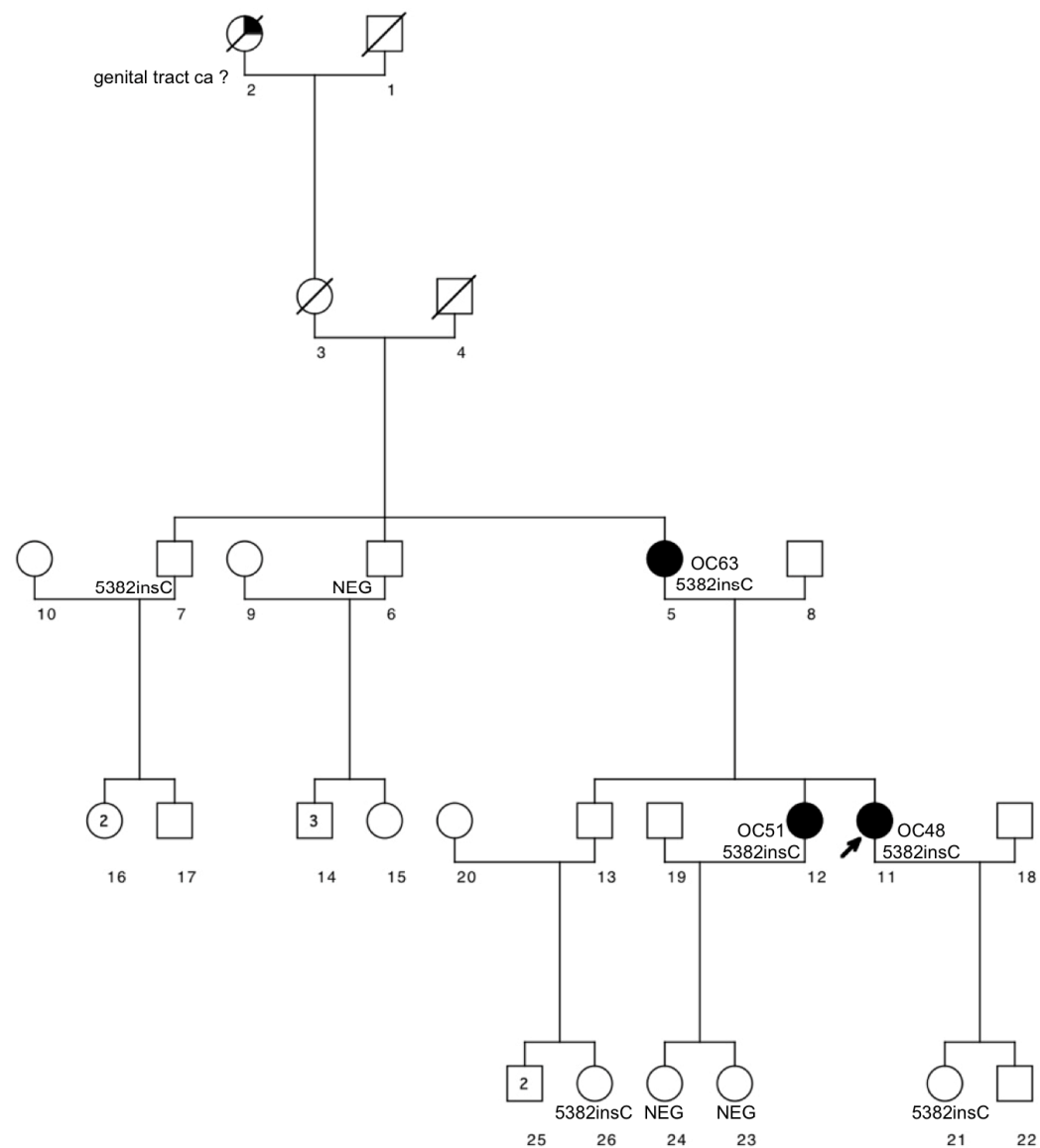
rodzina nr.: PLG2/724

LEGENDA:

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

genital tract ca. ? - prawdopodobnie nowotwór dróg rodnych,

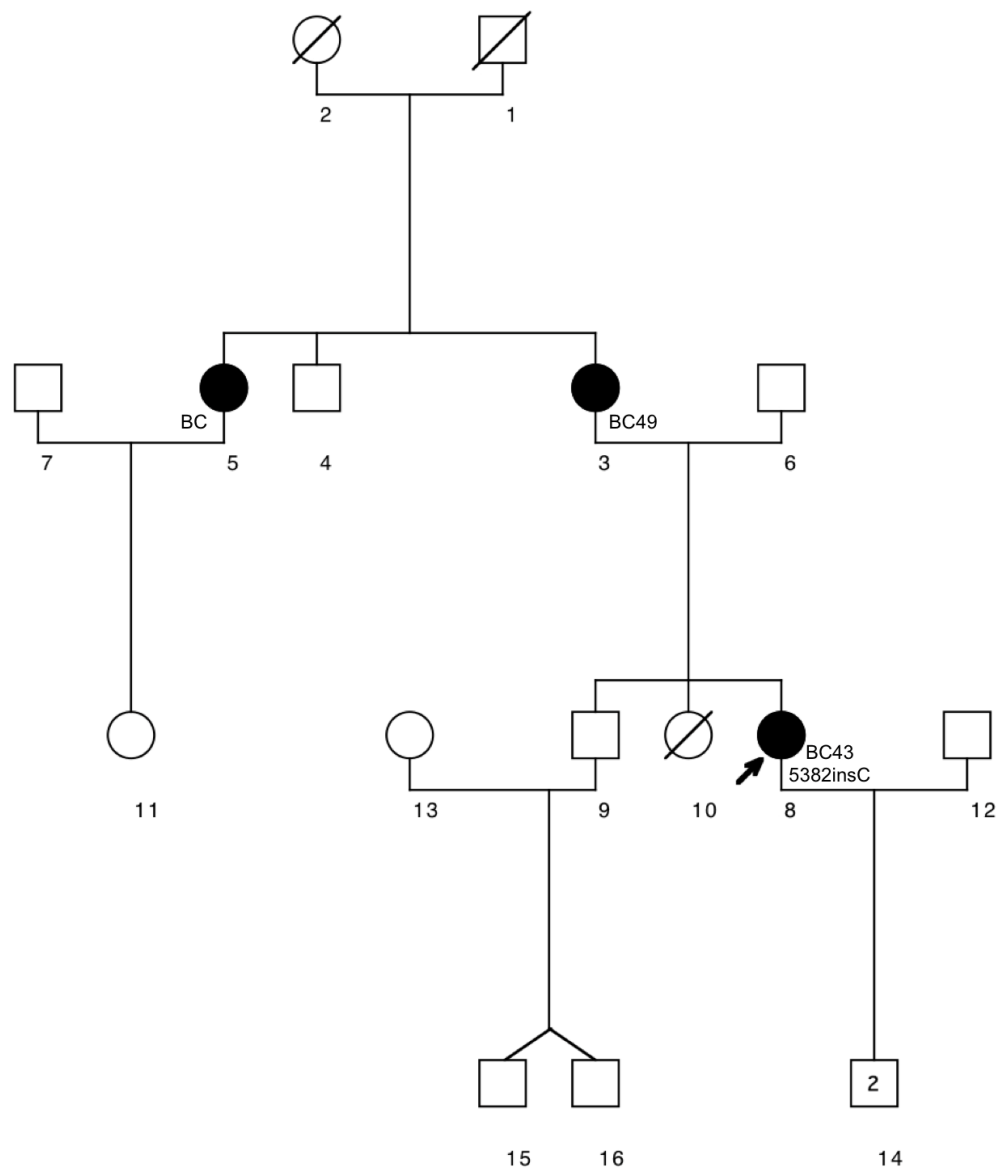
NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym, wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 819

LEGENDA:

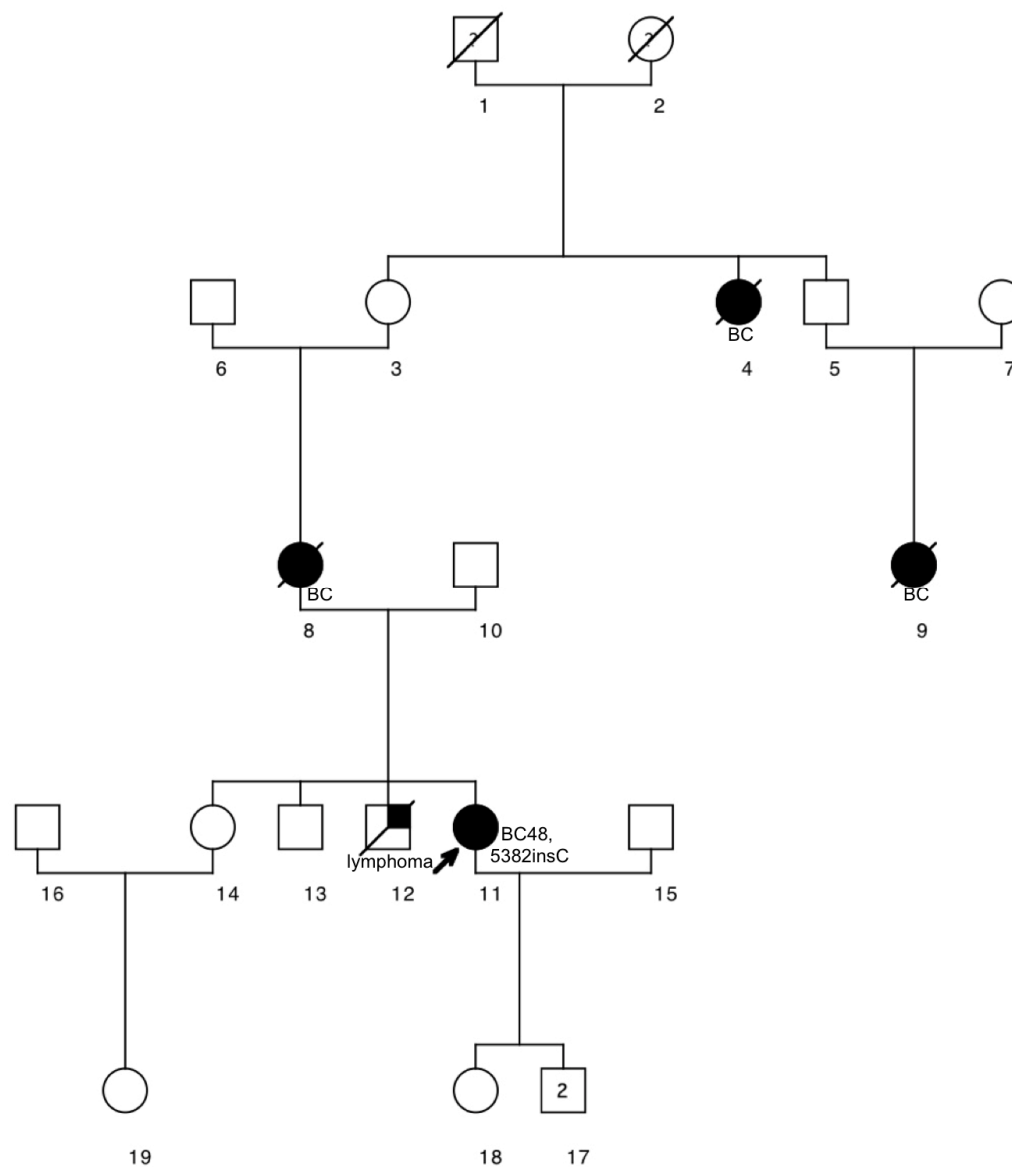
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: 839

LEGENDA:

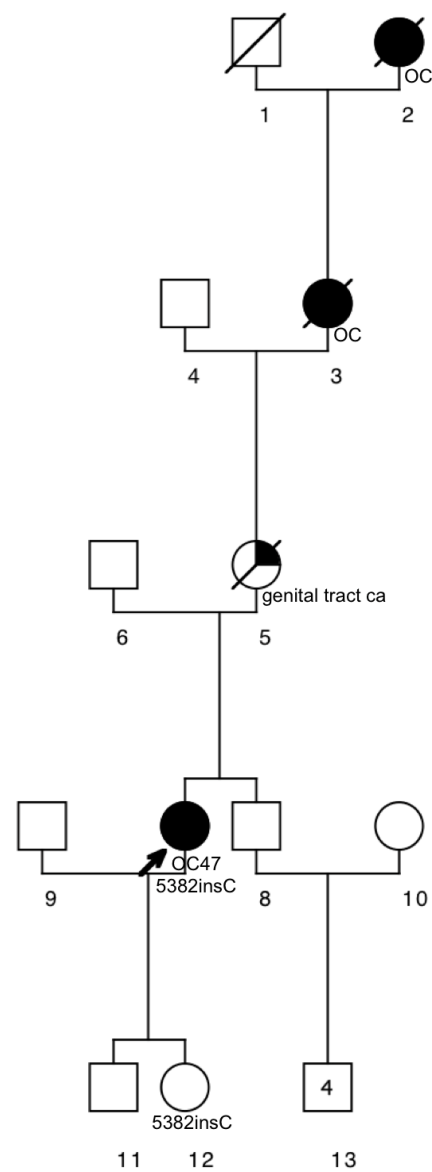
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
lymphoma - chłoniak



rodzina nr.: 876

LEGENDA:

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych



rodzina nr.: 910

LEGENDA:

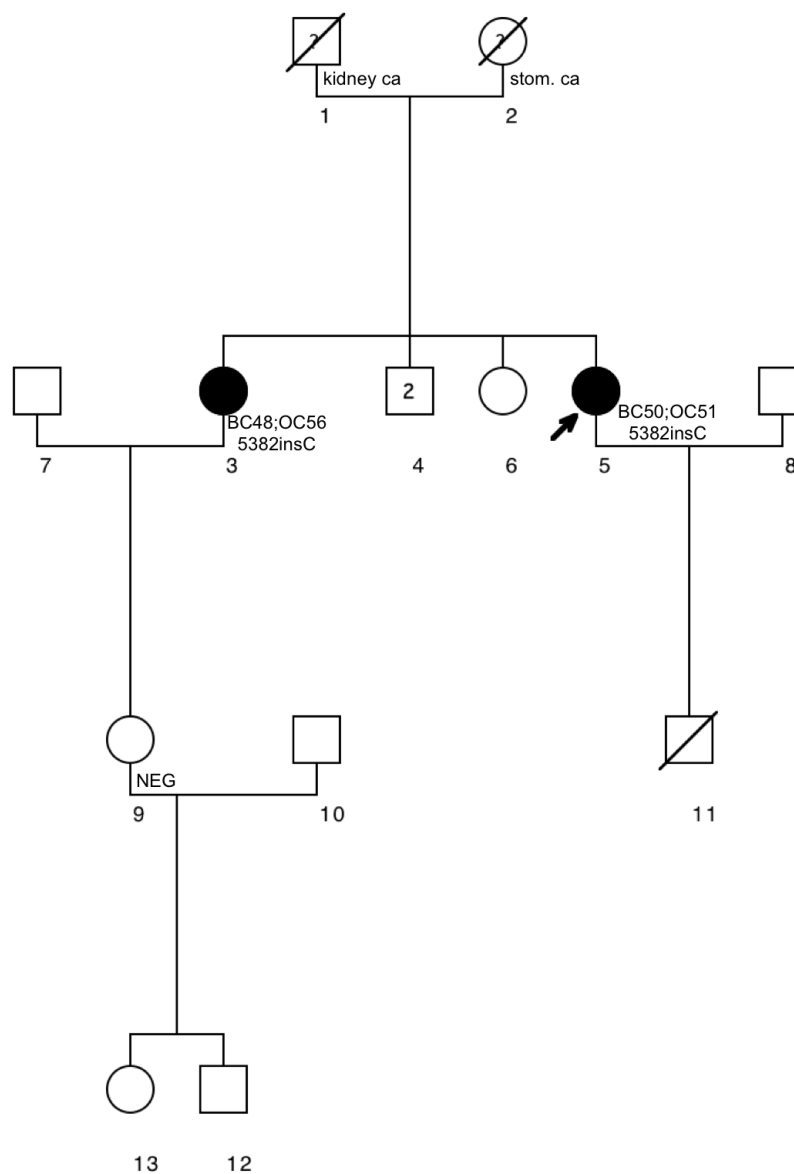
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

stom. ca - rak żołądka (ang. *stomach cancer*)

kidney ca - rak nerki,

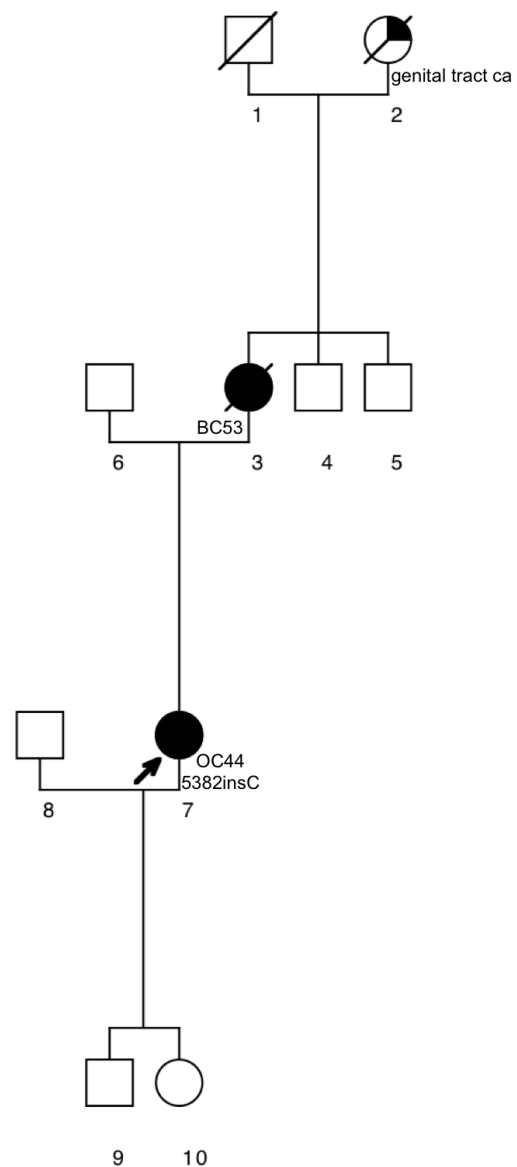
NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym, wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 973

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
genital tract ca. - nowotwór dróg rodnych



rodzina nr.: 990

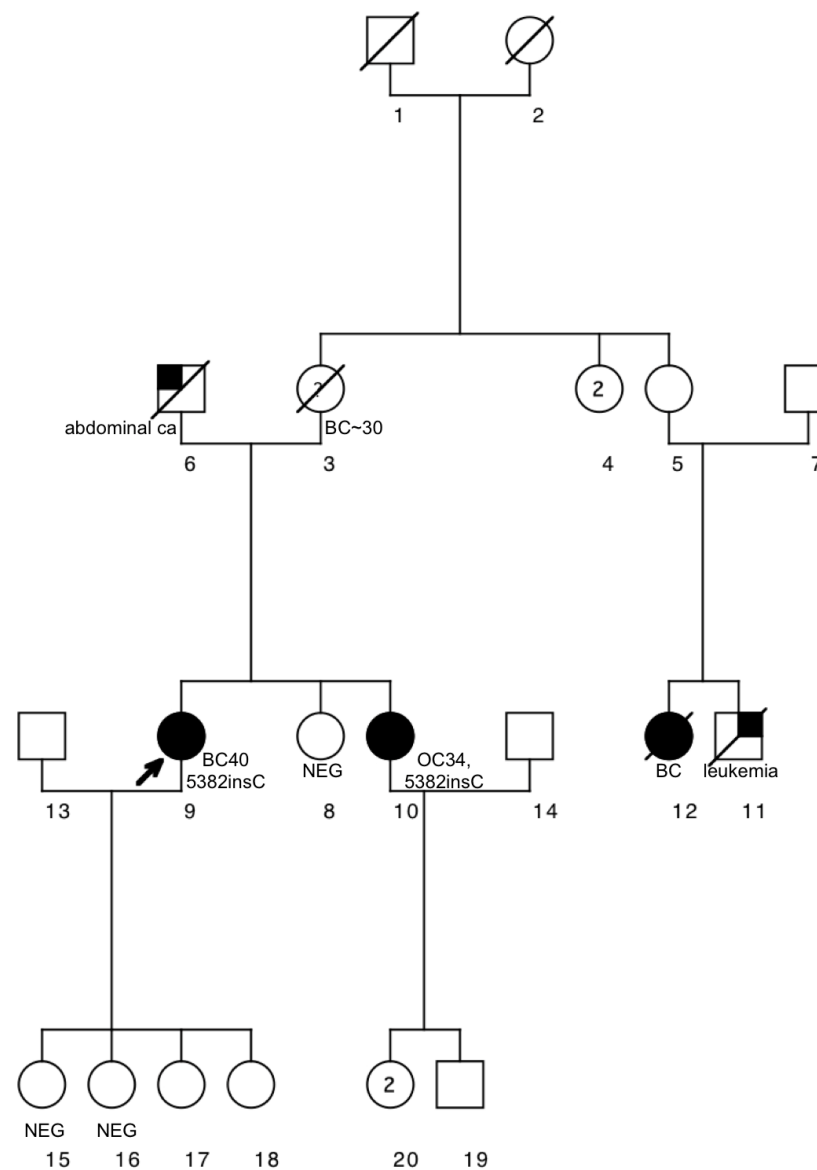
LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

abdominal ca - nowotwór w jamie brzusznej,

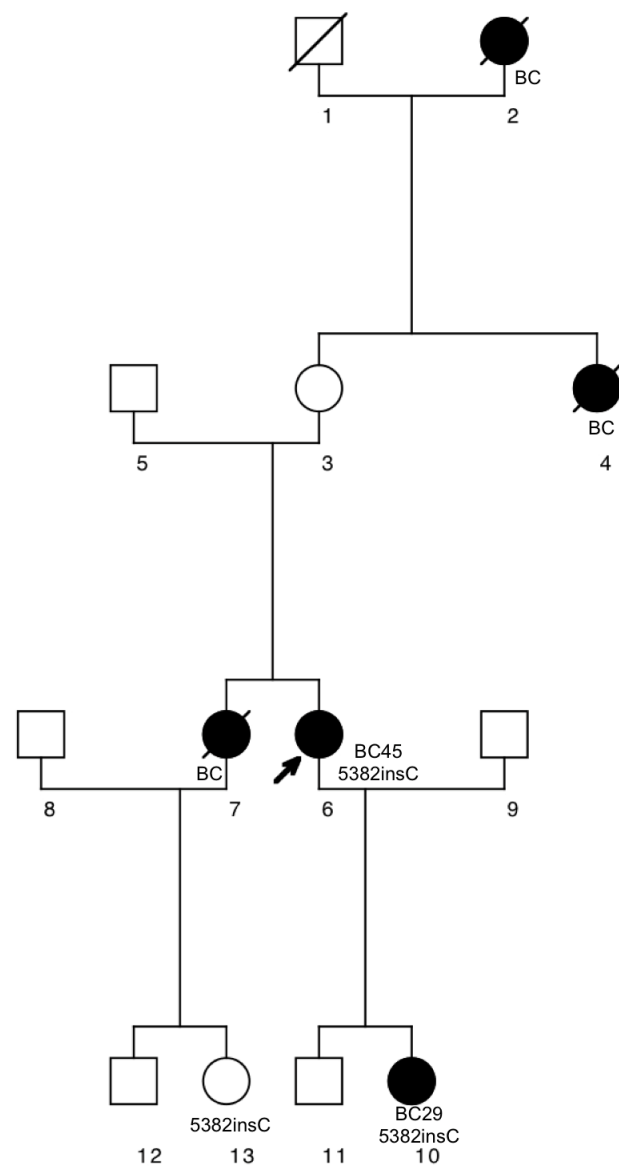
leukemia - białaczka



rodzina nr.: 1131

LEGENDA:

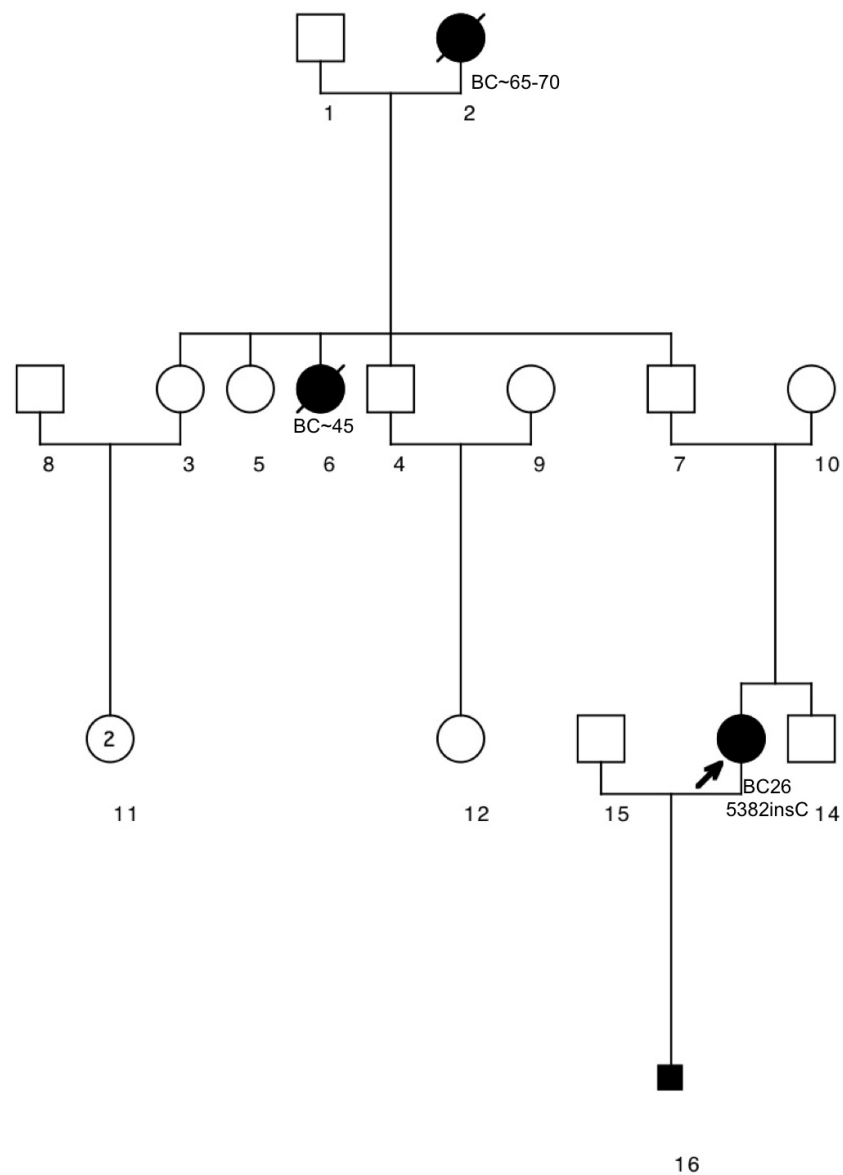
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: 1154

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: 1197

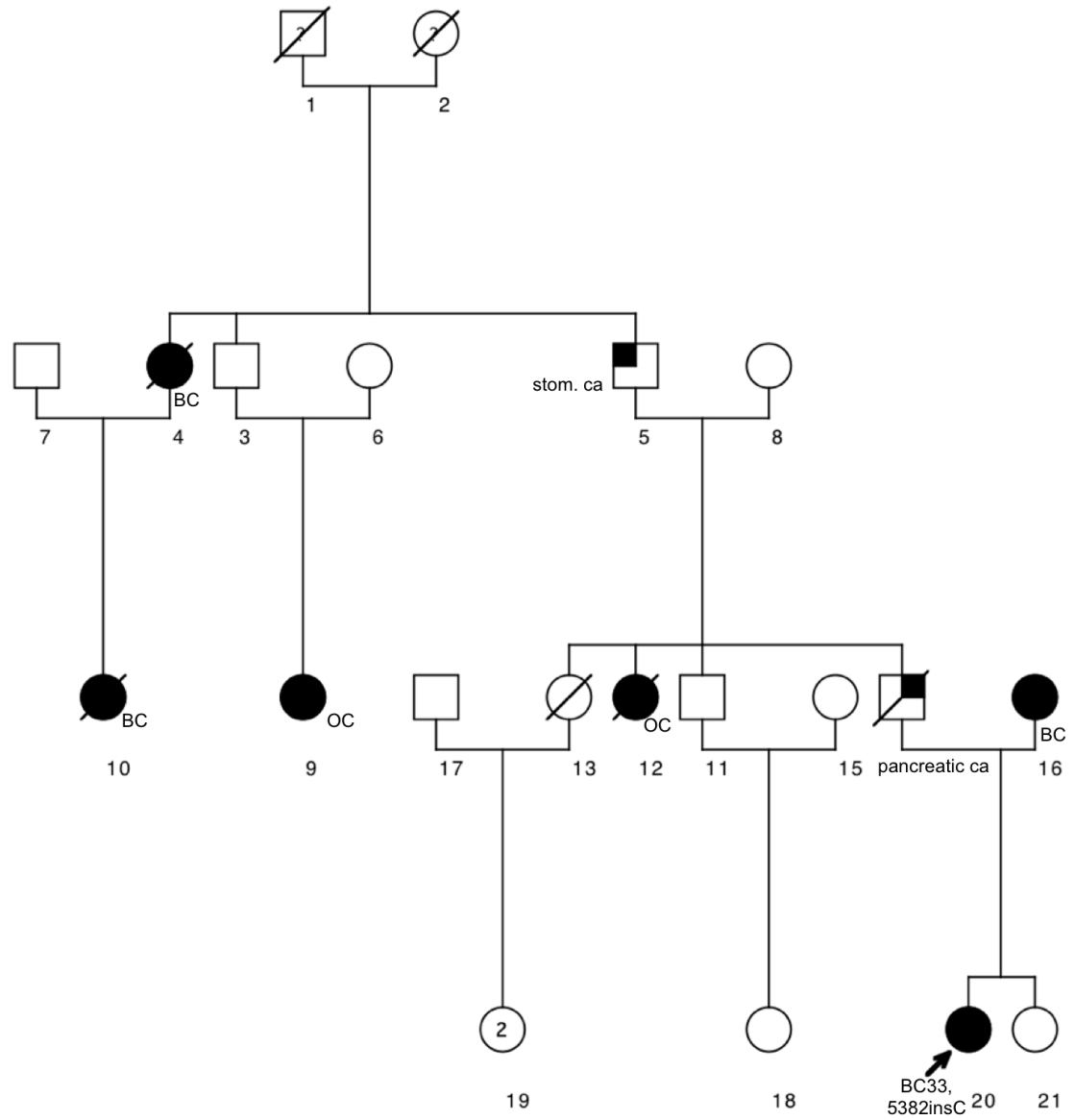
LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

stom. ca - rak żołądka (ang. stomach cancer),

pancreatic ca - rak trzustki



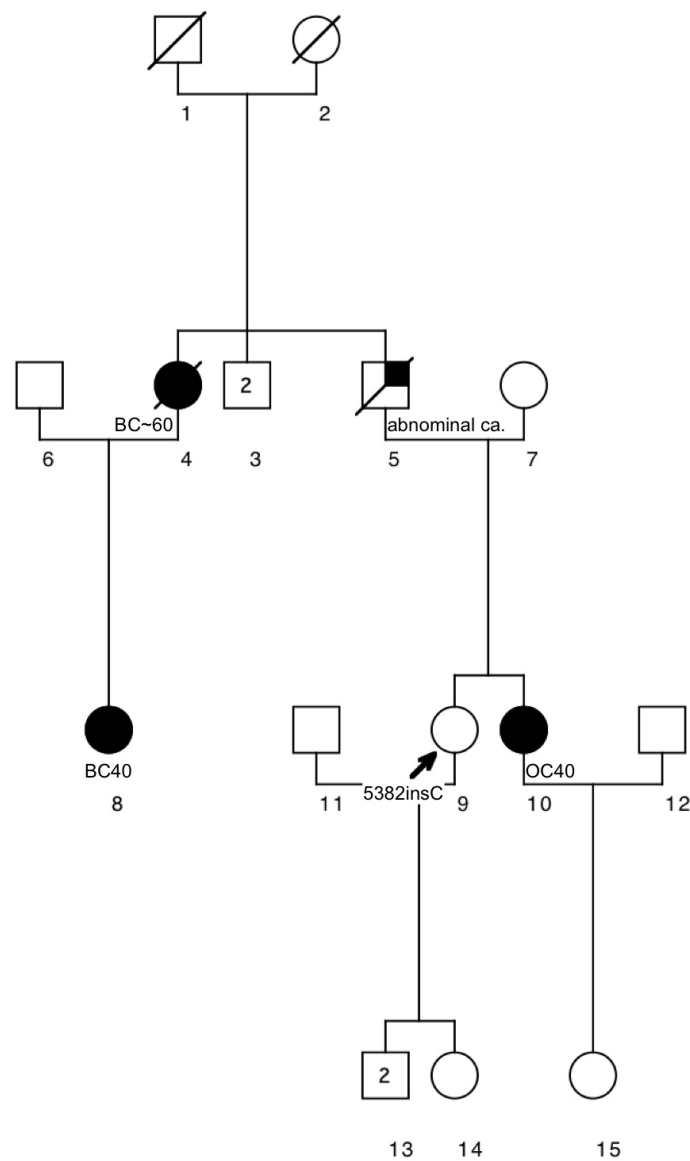
rodzina nr.: 1250

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),

OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),

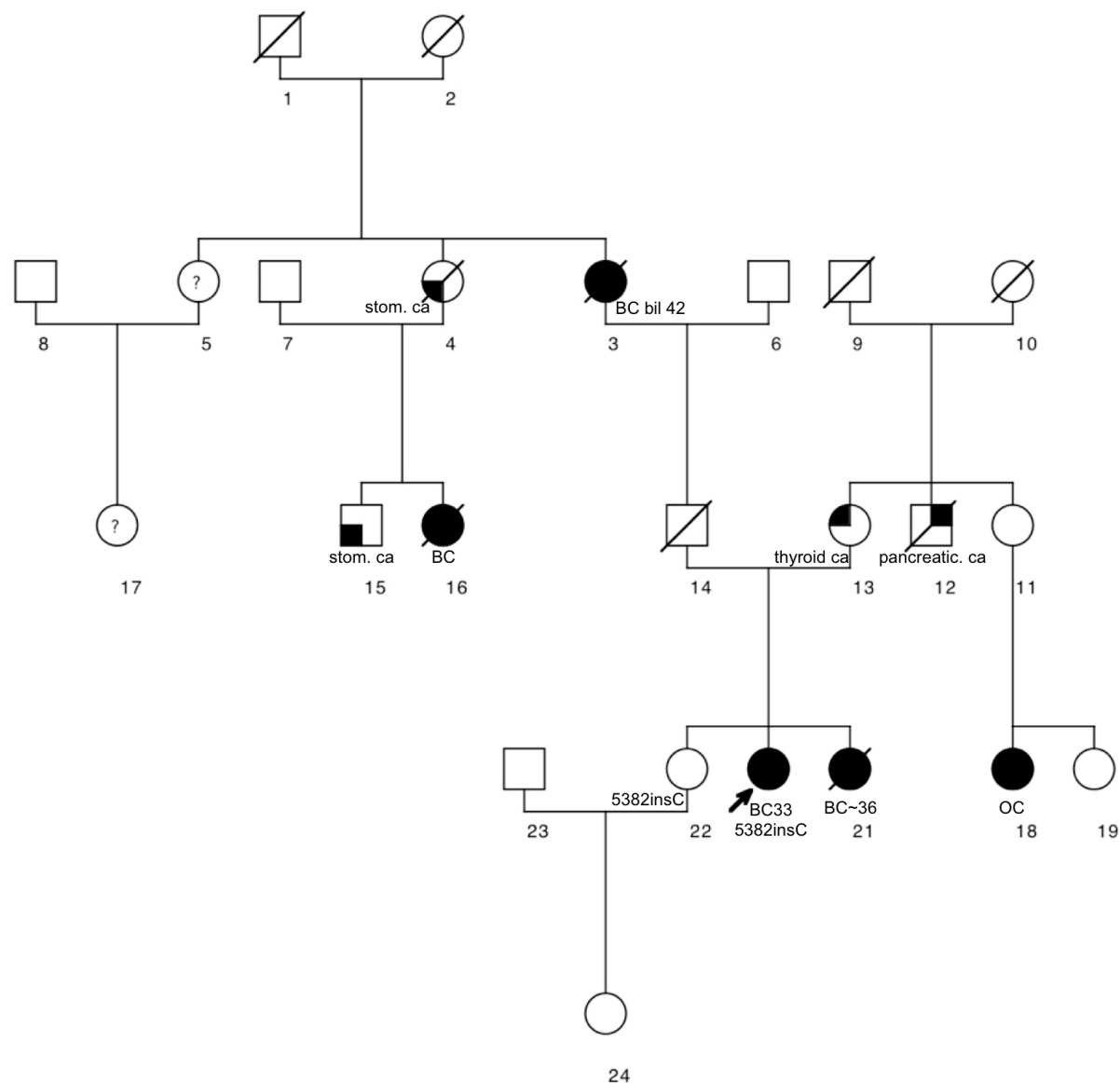
abdominal ca - nowotwór w jamie brzusznej



rodzina nr.: 1306

LEGENDA:

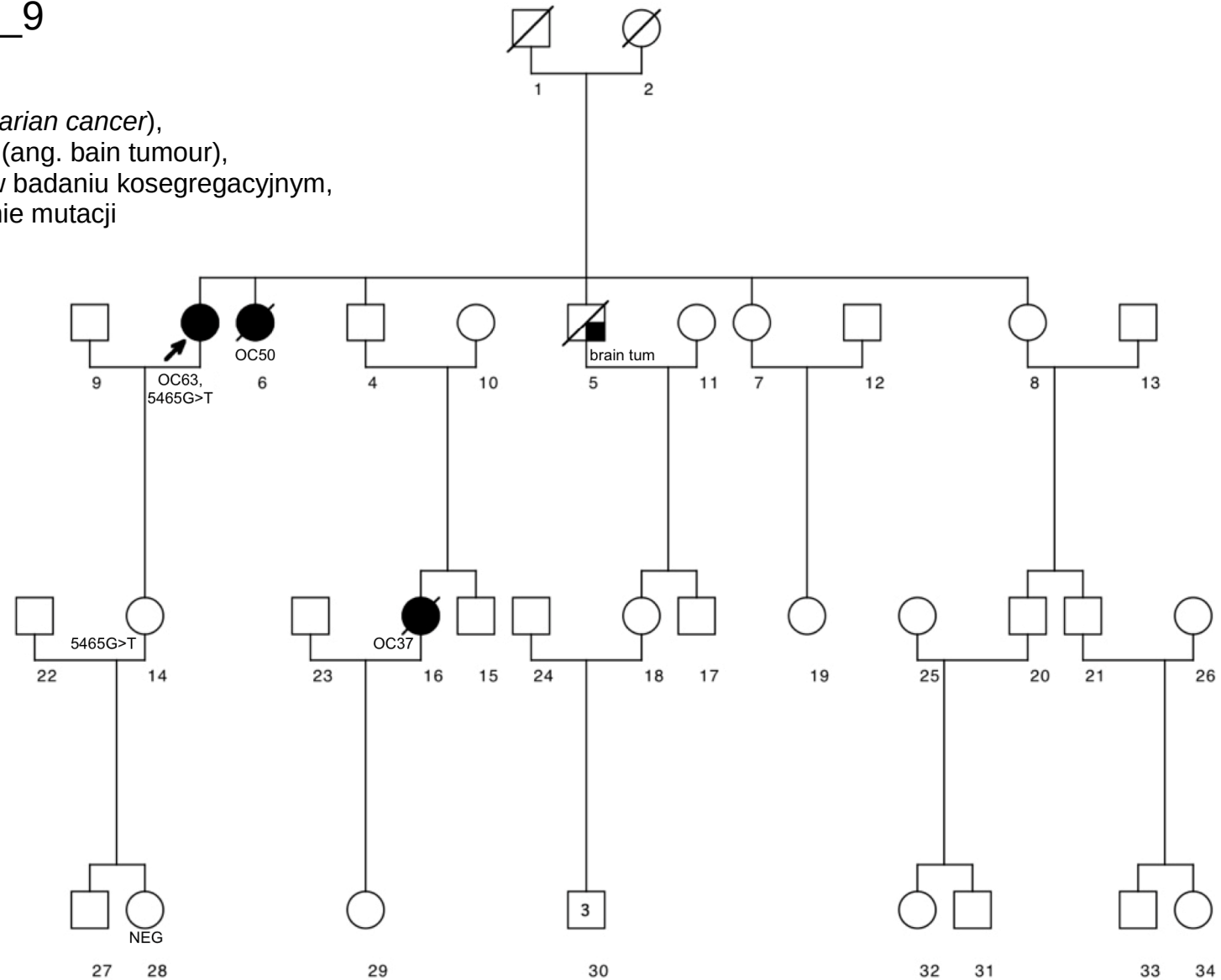
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
BC bil - obustronny rak piersi
(ang. *bilateral breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
stom. ca - rak żołądka (ang. *stomach cancer*)
pancreatic ca - rak trzustki
thyroid ca - rak tarczycy



rodzina nr.: brca_9

LEGENDA:

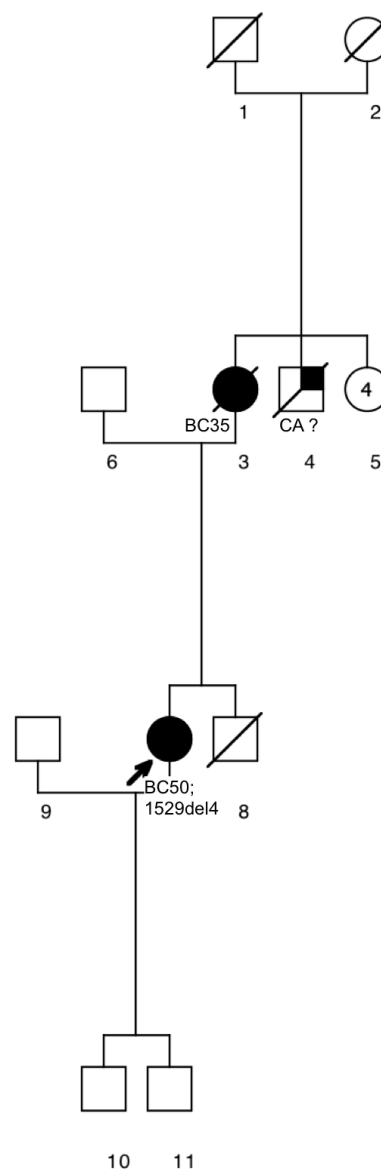
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
brain tum. - guz mózgu (ang. *brain tumour*),
NEG- osoby u których, w badaniu kosegregacyjnym,
 wykluczono występowanie mutacji



rodzina nr.: 1223

LEGENDA:

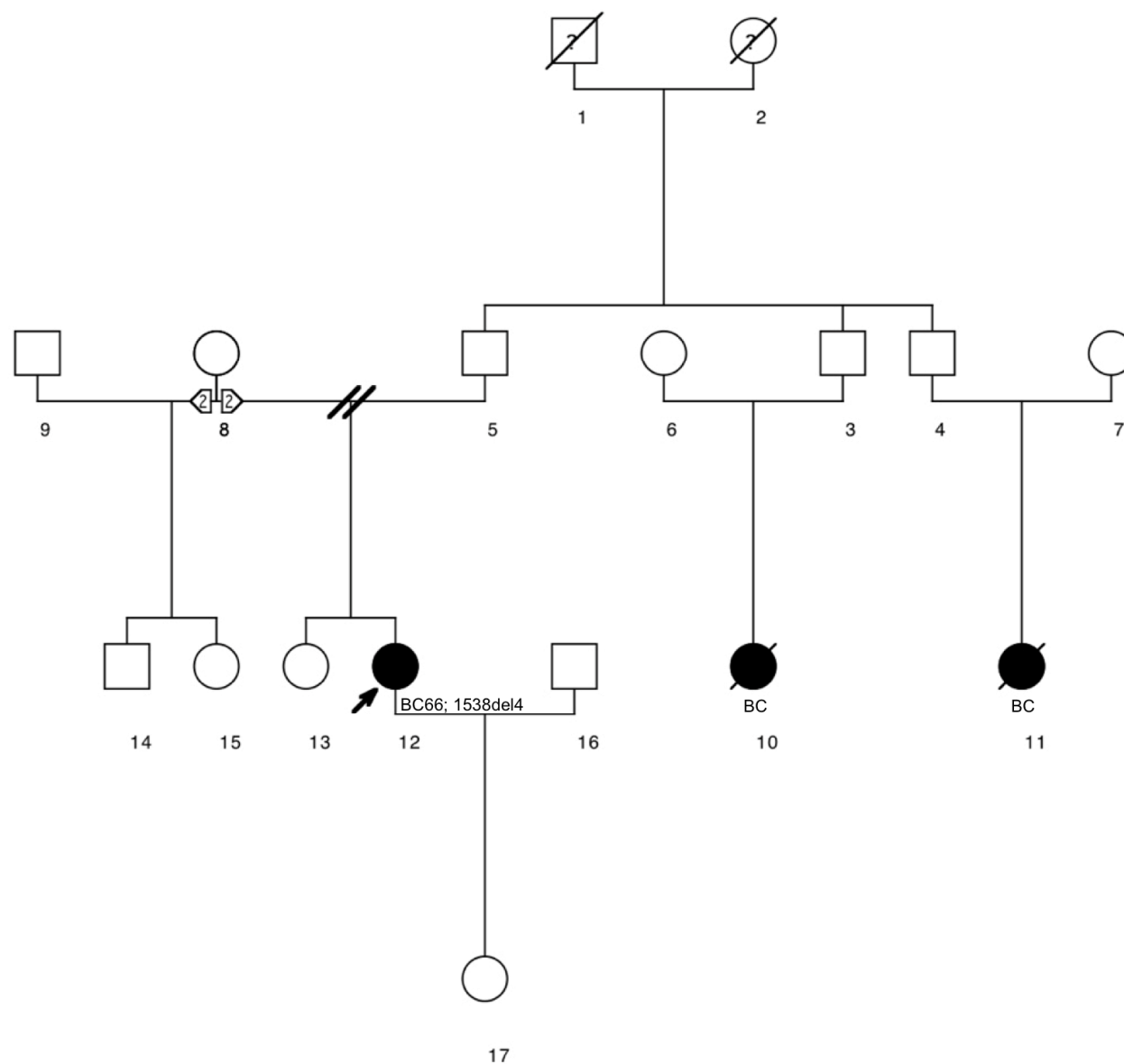
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
ca? - prawdopodobnie nowotwór



rodzina nr.: 1133

LEGENDA:

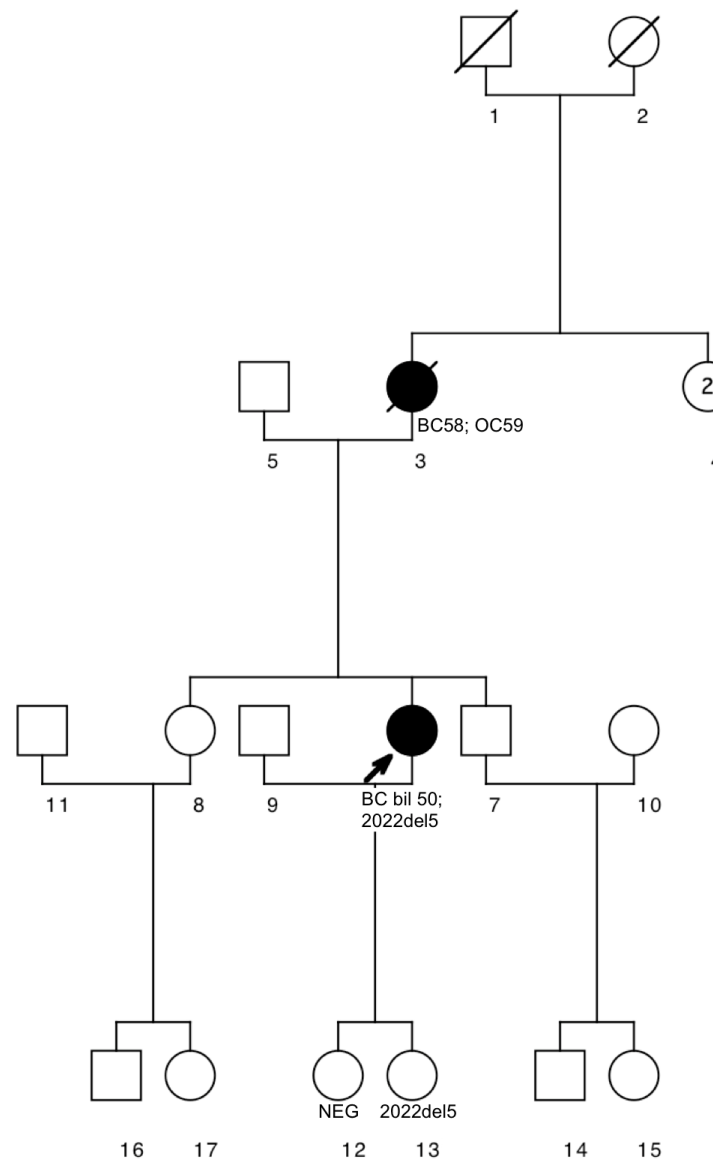
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: 1724

LEGENDA:

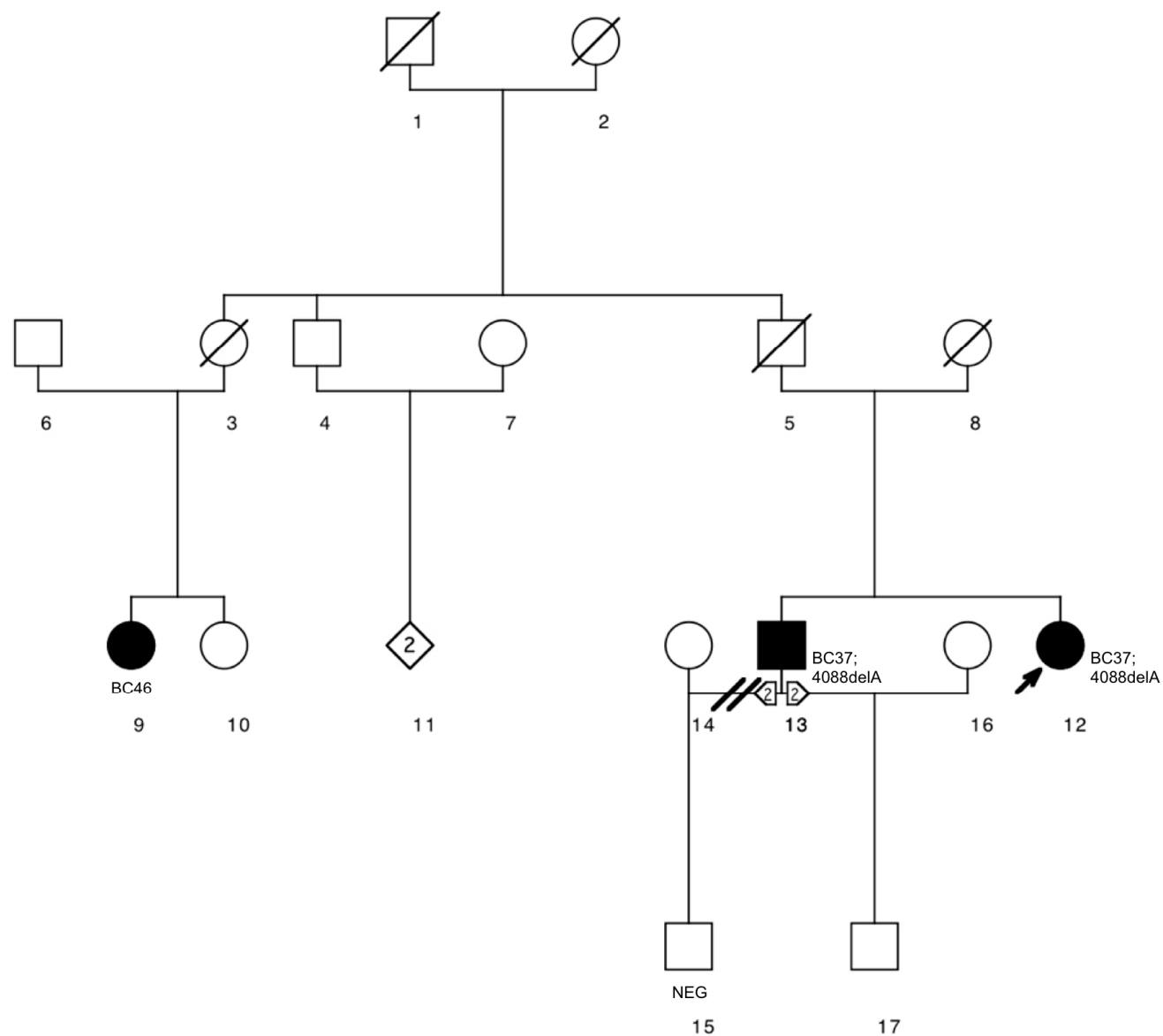
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
BC bil - obustronny rak piersi
(ang. *bilateral breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
NEG- osoby u których, w badaniu
kosegregacyjnym, wykluczono występowanie
mutacji



rodzina nr.: brca_62/1

LEGENDA:

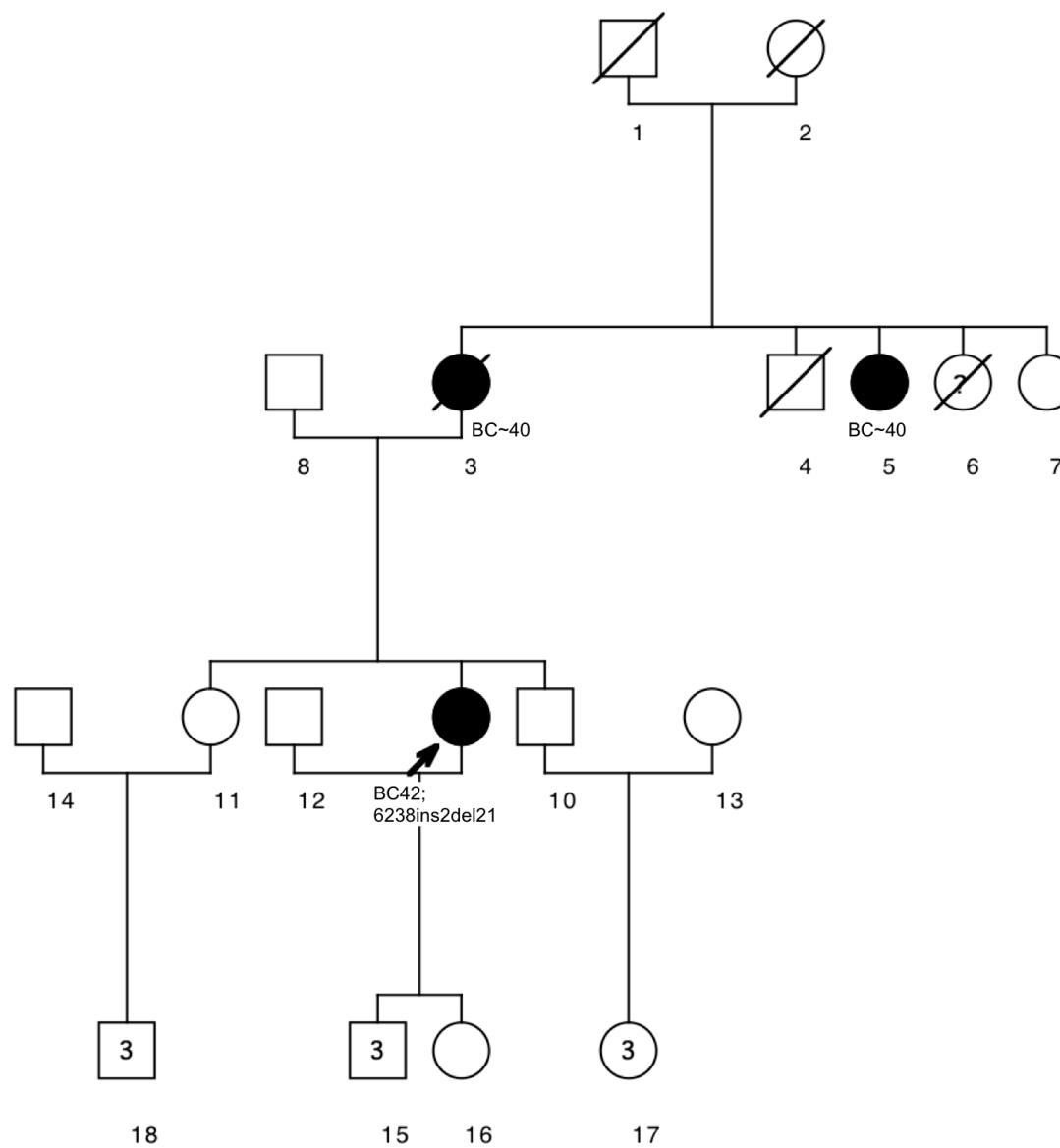
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
NEG- osoby u których, w badaniu
kosegregacyjnym, wykluczono
występowanie mutacji



rodzina nr.: 703

LEGENDA:

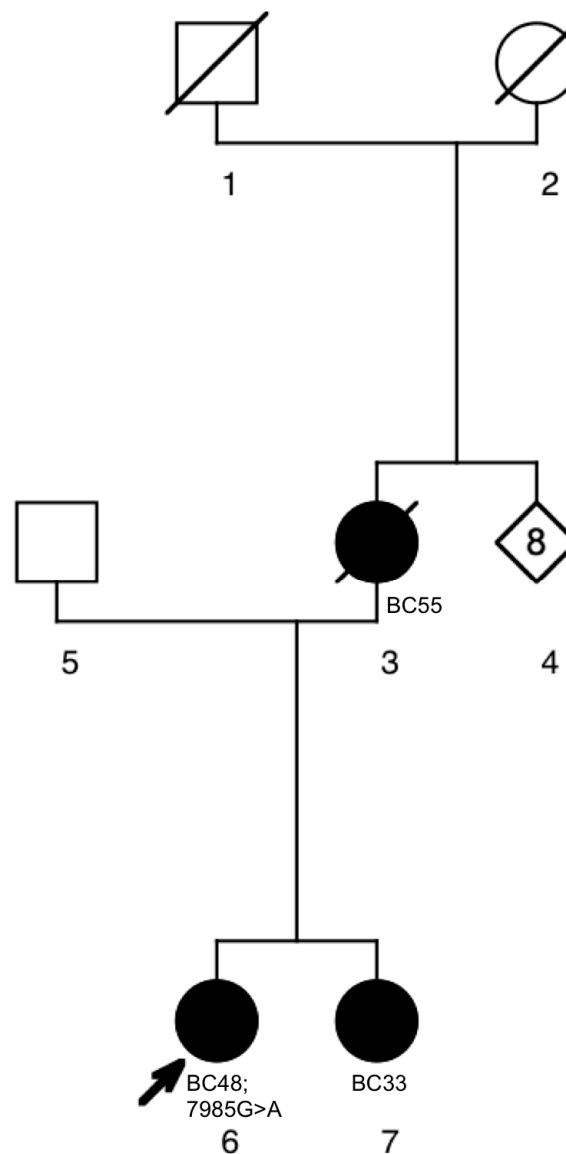
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: brca_40

LEGENDA:

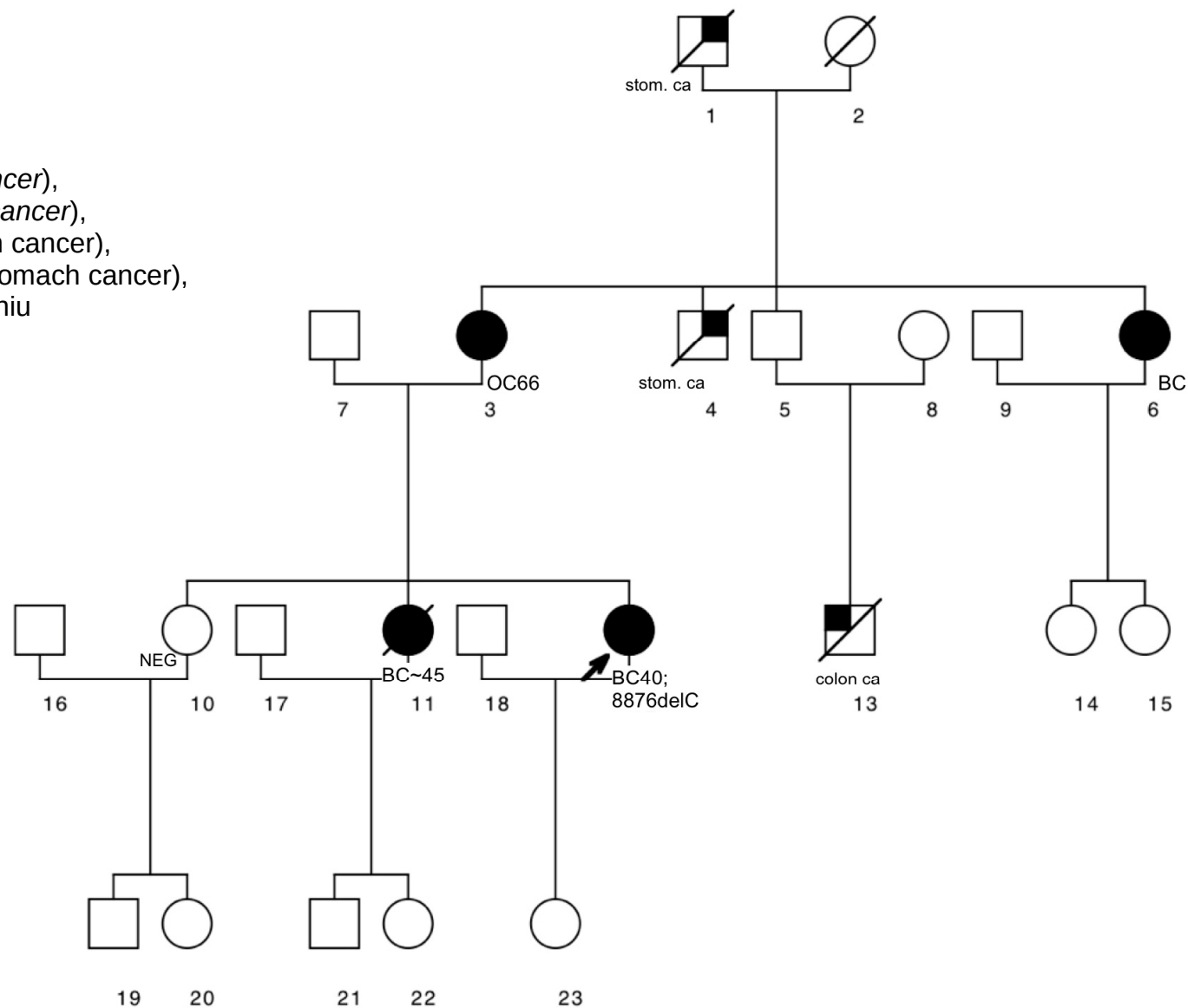
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*)



rodzina nr.: 832

LEGENDA:

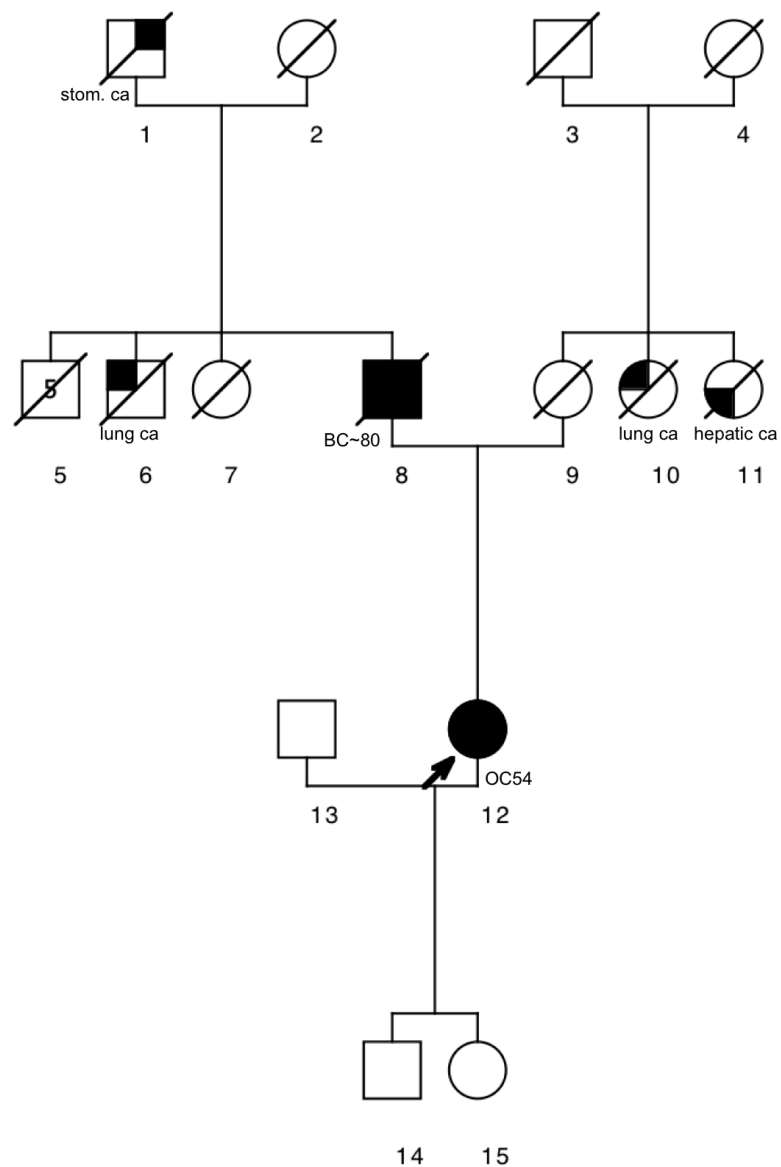
BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
colon ca - rak jelita (ang. *colon cancer*),
stom. ca - rak żołądka (ang. *stomach cancer*),
NEG- osoby u których, w badaniu
kosegregacyjnym, wykluczono
występowanie mutacji



rodzina nr.: 21

LEGENDA:

BC - rak piersi (ang. *breast cancer*),
OC - rak jajnika (ang. *ovarian cancer*),
stom. ca - rak żołądka (ang. *stomach cancer*),
lung ca - rak płuca (ang. *lung cancer*),
hepatic ca - nowotwór wątroby



Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy:

Panu Profesorowi Januszowi Limonowi za opiekę nad moim rozwojem naukowym,

Dr Izabeli Brożek oraz koleżankom i kolegom z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki za życzliwość i wsparcie,

Profesorowi Åke Borgowi za wprowadzenie mnie w zagadnienia związane z dziedzicznym rakiem piersi i jajnika,

Oraz mojej rodzinie: mamie, tacie, mężowi, córce za radość w moim życiu...