

# Analizy molekularne DNA i RNA w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów

W ostatnich latach zidentyfikowano szereg genów, których mutacje odpowiedzialne są za wysoką dziedziczną predyspozycję do nowotworów (1).

U nosicieli mutacji tych genów ryzyko zachorowania na chorobę nowotworową może wynosić nawet 90%. Wybrane geny związane z predyspozycją do nowotworów dziedzicznych i najczęściej badane w praktyce lekarskiej zestawiono w tabeli 1.

**Tab.1.** Geny, których mutacje predysponują do nowotworów dziedzicznych. Zestawienie obejmuje geny najczęściej badane w naszym laboratorium.

GEN lokalizacja	Predyspozycja do nowotworów	PENETRACJA*	LICZBA EKSONÓW DŁUGOŚĆ BIAŁKA
Rb <sub>[2]</sub> 13q14	siatkówczak	ok. 90%	27 eksonów
BRCA1 <sub>[3]</sub> 17q21	sutek		24 eksony, 2 transkrypty różniące się pierwszym eksonem
BRCA2 13q	prostata jelito grube	ok. 80%	1 863 aminokwasy 27 eksonów 3 418 aminokwasów
VHL <sub>[4]</sub> 3p25–26	naczyniaki mózdzku, siatkówki, raki nerki, guzy nadnercza	ok. 80%	3 eksony 213 aminokwasów
MSH2 <sub>[5]</sub> 2p22	rak jelita grubego, raki trzonu macicy,	ok. 90% dla mężczyzn	16 eksonów 934 aminokwasy
MLH1 3p22–23	żołądka, jelita cienkiego nerki i pęcherza moczowego, przewodów żółciowych,	ok. 70% dla kobiet [6]	19 eksonów 756 aminokwasów
MSH6 2p 16	jajników		10 eksonów 1 361 aminokwasów

\*prawdopodobieństwo zachorowania w ciągu życia na nowotwór u nosiciela mutacji

Opracowano szereg metod molekularnych, które pozwalają na wykrywanie mutacji. Można je podzielić na metody:

I bezpośredniego,

II pośredniego wykrywania mutacji.

**Ad. I. Bezpośrednie wykrywanie mutacji** jest najbardziej swoistą metodą wykrywania zaburzeń w obrębie genu. Umożliwia rozpoznanie nosicielstwa mutacji niemal ze 100% pewnością.

**Ad. II. Pośrednie wykrywanie mutacji** jest metodą o nieco mniejszej swoistości pozwala natomiast na potwierdzenie lub wykluczenie nosicielstwa mutacji w wielu przypadkach, w których nie można wykryć zmian bezpośrednio w genach.

Metody wykrywania mutacji klasyfikowane są również w zależności od tego, czy służą do diagnozowania mutacji nieznanymi czy też znanymi i powtarzalnymi, ze względu na zasadnicze różnice w czułości identyfikowania i efektywności ekonomicznej.

## Wykrywanie nieznanymi mutacji

Zastosowanie technik wchodzących w skład tych metod w odpowiednio dobranych pod względem cech rodowodowo-klinicznych przypadkach jest w praktyce lekarskiej uzasadnione mimo tego, że techniki te jak dotychczas są złożone, pracochłonne i kosztowne.

### I. Techniki bezpośredniego wykrywania nosicielstwa mutacji

#### 1. Analizy DNA

Zasadnicze rodzaje analiz:

1a / izolacja DNA

1b / amplifikacja fragmentów genów, z reguły sekwencji kodujących

1c / wstępne wykrywanie zaburzeń w produktach amplifikacji technikami przesiewowymi

1d / sekwencjonowanie

1e / metoda Southerna

1f / zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond

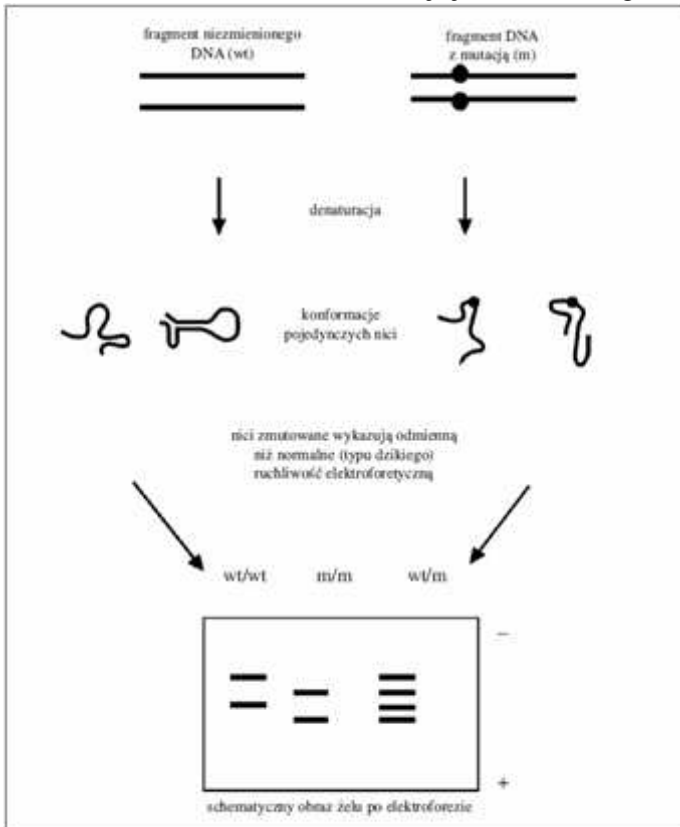
**Ad. 1a.** Materiał do izolacji DNA stanowią na ogół komórki łatwo dostępne, takie jak leukocyty z krwi obwodowej lub rzadziej biopsjaty innych tkanek. W trakcie analiz wykrywana jest mutacja konstytucyjna, a więc obecna we wszystkich komórkach pacjenta. Materiał do badania najlepiej pobrać bezpośrednio przed izolacją, ale dobre wyniki uzyskuje się również po kilkudniowym przechowywaniu krwi w temperaturze pokojowej lub nawet przez kilka lat w temperaturze poniżej zera. Jeżeli nie dysponujemy tkankami świeżymi to izolację DNA można wykonać z tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w bloczkach parafinowych, chociaż uzyskanie jednoznacznych wyników z takiego materiału jest trudne, niekiedy wręcz niemożliwe. Izolowanie DNA polega na usunięciu białek z lizatu komórkowego. Zwykle uzyskuje się to poprzez trawienie proteinazą K i ekstrakcji w mieszaninie fenolu i chloroformu. Z odbiałczonych w ten sposób próbek kwasy nukleinowe wytrąca się alkoholami: etylowym lub izopropylowym.

**Ad. 1b.** W tej analizie powielane są fragmenty badanego DNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerizacji (*PCR*). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi: matryca DNA (zwykle genomowa DNA), polimeraza DNA, para specyficznych starterów („*primers*”), trójfosforany deoksyrybonukleotydów oraz bufor reakcyjny. Mieszanina ta poddawana jest w specjalnym termostacie cyklicznym zmianom temperatury. Każdy cykl składa się z trzech etapów: denaturacji, przyłączania starterów i syntezy. Po 22 cyklach, przy 100% wydajności, liczba kopii powielanego fragmentu zwiększa się milion razy.

**Ad. 1c.** Niegdyś popularną techniką wstępnego wykrywania zaburzeń w produktach amplifikacji było badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA -SSCP (*single stranded conformational polymorphism*) (7).

Inne techniki tego rodzaju to analiza heterodupleksów – HET (*heteroduplex analysis*) (8), chemiczne rozszczepianie niesparowań heterodupleksów - CMC (*chemical mismatch cleavage*) (9) DHPLC (*Denaturing High-performance Liquid Chromatography*) (10) i elektroforeza na żelach z gradientem czynnika denaturującego -DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) (11).

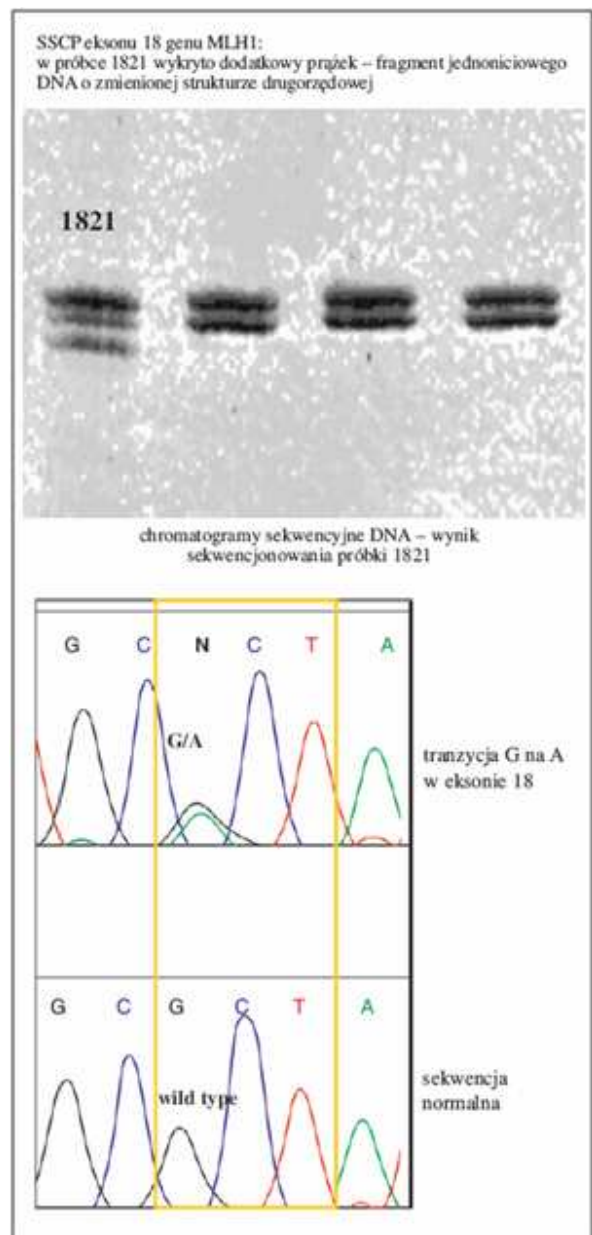
**SSCP - badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA**



Ryc. 1. Zasada SSCP

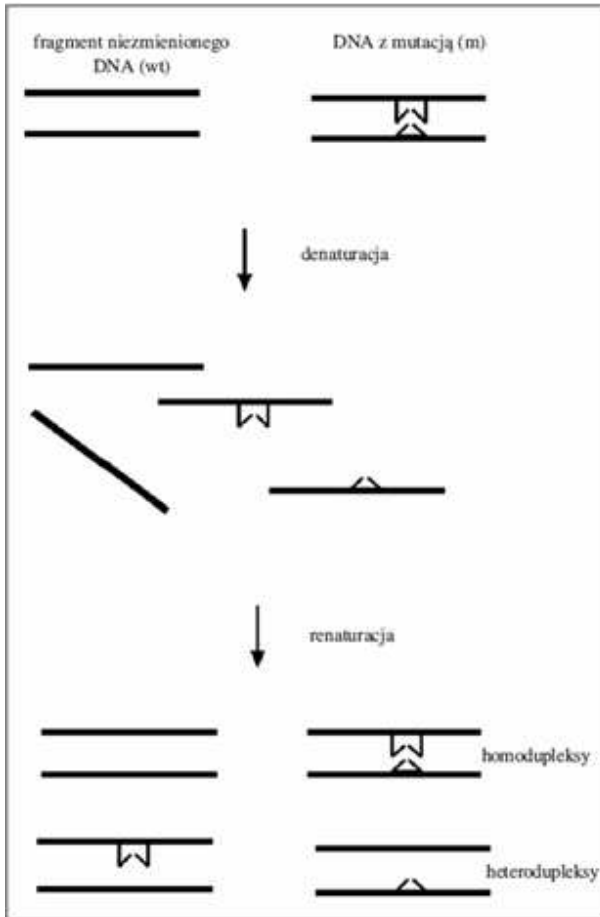
ta zależy od rodzaju i sekwencji zasad tworzących nić DNA. Mutacje punktowe, delecje i insercje powodują zmiany struktury drugorzędowej, która wpływa na szybkość poruszania się nici w trakcie elektroforezy na niedenaturujących żelach poliakrylamidowych. Nici normalne i zmutowane wykazują odmienną ruchliwość elektroforetyczną (ryc. 1 i 2). W ostatnich latach wprowadzono szereg udoskonaleń tej techniki, dzięki którym można wykonać analizę na gotowych żelach w kontrolowanej temperaturze, a barwienie żeli (srebrzenie) zostało całkowicie zautomatyzowane. Cała procedura trwa niespełna dwie godziny. Do zalet tej analizy należy również to, że startery zsyntetyzowane do SSCP mogą być równocześnie stosowane do

Technika ta opiera się na tym, że jednoniciowe DNA w roztworze wykazuje określoną strukturę drugorzędową. Struktura



Ryc. 2. Wykrycie mutacji konstytucyjnej genu MLH1 techniką SSCP potwierdzone sekwencjonowaniem.

sekwencjonowania, analizy heterodupleksów oraz chemicznego rozszczepiania niesparowań heterodupleksów. Niedogodności SSCP to przede wszystkim konieczność analizowania produktów PCR nie dłuższych niż 200-300 pz (par zasad), bowiem przy większej długości produktów spada znacząco czułość wykrywania mutacji. Dlatego by ocenić sekwencję kodującą dużych genów trzeba wykonać wiele reakcji PCR. Wielu autorów podkreśla, że czułość SSCP w wykrywaniu mutacji nie przekracza 80% (12).

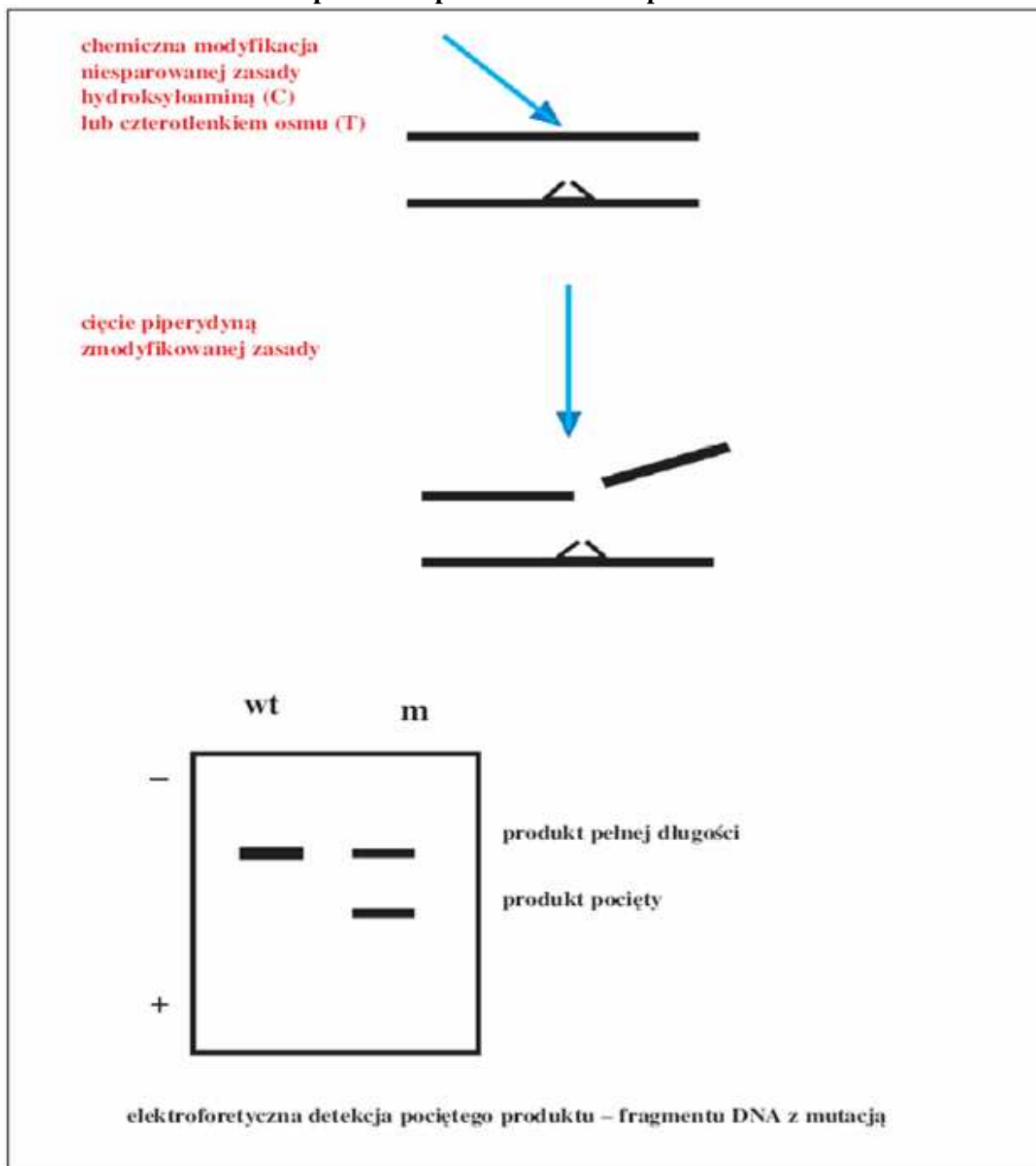


Ryc. 3. Powstanie heterodupleksów

### HET - analiza heterodupleksów

HET podobnie jak SSCP jest techniką względnie prostą. Jeżeli sekwencje niezmiennego (typu dzikiego) oraz sekwencje z mutacją są obecne w reakcji PCR (jako matryce) to produktami tej reakcji są cztery różne dwuniciowe fragmenty DNA (ryc.3). Dwa z nich to homodupleksy, czyli struktury dwuniciowe w pełni komplementarne. Dwa inne to heterodupleksy zawierające miejsca niesparowane (*mismatch*). Heterodupleksy ze zmianą co najmniej jednej zasady mogą wykazywać inną w porównaniu do homodupleksów ruchliwość podczas elektroforezy na zwykłym poliakrylamidowym żelu. Czułość tej analizy w wykrywaniu mutacji nie jest dobrze znana. Szacuje się, że w niektórych układach doświadczalnych może wynosić nawet 90% (8). Według niektórych autorów stosując HET można wykrywać niekiedy zaburzenia genów, które nie są wykrywane przez SSCP. Ponieważ reakcje PCR do HET i SSCP są takie same, a różnica w wykonaniu doświadczeń pomiędzy technikami sprowadza się jedynie do różnej obróbki produktów amplifikacji, wielu autorów proponuje stosowanie w każdym przypadku zarówno HET jak i SSCP celem zwiększenia czułości wykrywania mutacji stosunkowo niewielkim kosztem (13).

## CMC - chemiczne rozszczepianie niesparowań heterodupleksów



Ryc. 4. Zasada CMC

Zamiana nukleotydów w wyniku mutacji prowadzi do tego, że heterodupleksy powstające w wyniku reakcji PCR mają miejsca niesparowania, w których złamana jest reguła, że w strukturze dwuniciowego DNA naprzeciwko C znajduje się G i tworzy potrójne wiązanie wodorowe, a komplementarnie do A znajduje się T tworząc podwójne wiązanie wodorowe. Niesparowane w heterodupleksach zasady C i T ulegają chemicznej modyfikacji, odpowiednio z hydroksyloaminą i czterotlenkiem osmu. Miejsca wiązania tych substancji są cięte z użyciem piperydny. Pocięte fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie (ryc.4). Zaletą metody jest niezwykle wysoka czułość bliska 100%, a także możliwość wykrywania mutacji w odcinkach DNA długości 1-2 kpz (tysięcy par zasad) (12). Główną

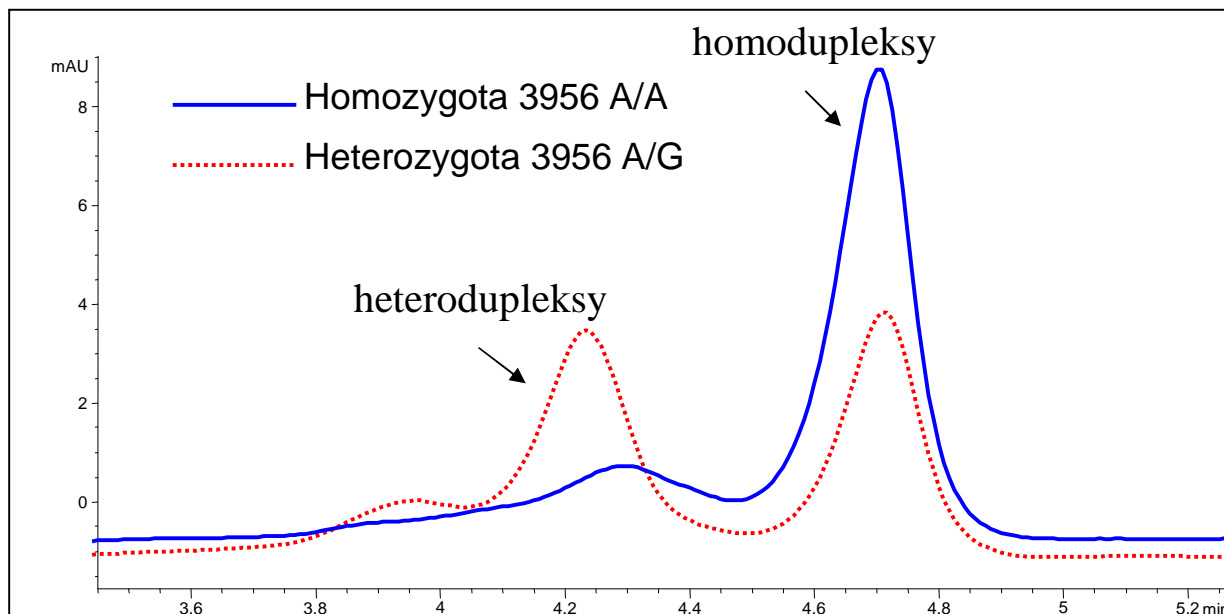
wadą techniki jest toksyczność chemikaliów, jak i większa złożoność procedury w porównaniu z SSCP czy HET.

### DHPLC - wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa

Najlepszą i coraz częściej używaną techniką wstępnego wykrywania zmian jest DHPLC (10, 14, 15, 16, 17). Jest to odmiana HET wykorzystująca wysoką rozdzielczość nowoczesnych wypełnień kolumn chromatograficznych. Rozdział analizowanych fragmentów DNA przeprowadzany jest w gradiencie czynnika denaturującego. W warunkach subdenaturacyjnych heterodupleksy wykazują mniejsze powinowactwo niż homodupleksy do złoża kolumny i łatwiej ulegają wymyciu. Całość rozdziału monitorowana jest przez miernik absorbancji mierzonej przy 260nm. Profil elucji (ryc. 5) jest charakterystyczny i powtarzalny dla danej zmiany i pozwala na odróżnienie nowych zmian od wcześniej wykrytych mutacji bądź polimorfizmów.

Z danych literaturowych (18) i badań własnych (19) wynika, że DHPLC łączy zalety dotychczas stosowanych metod. Czułość metody sięga 100% (10, 16, 17) przy stosunkowo niskich kosztach (koszt odczynników najwyżej 20 złotych na próbkę) jest szybka, a przy zastosowaniu „autosamplera” pozwala wykonać analizę 200 próbek na dobę.

### Exon 19 *MLH1*



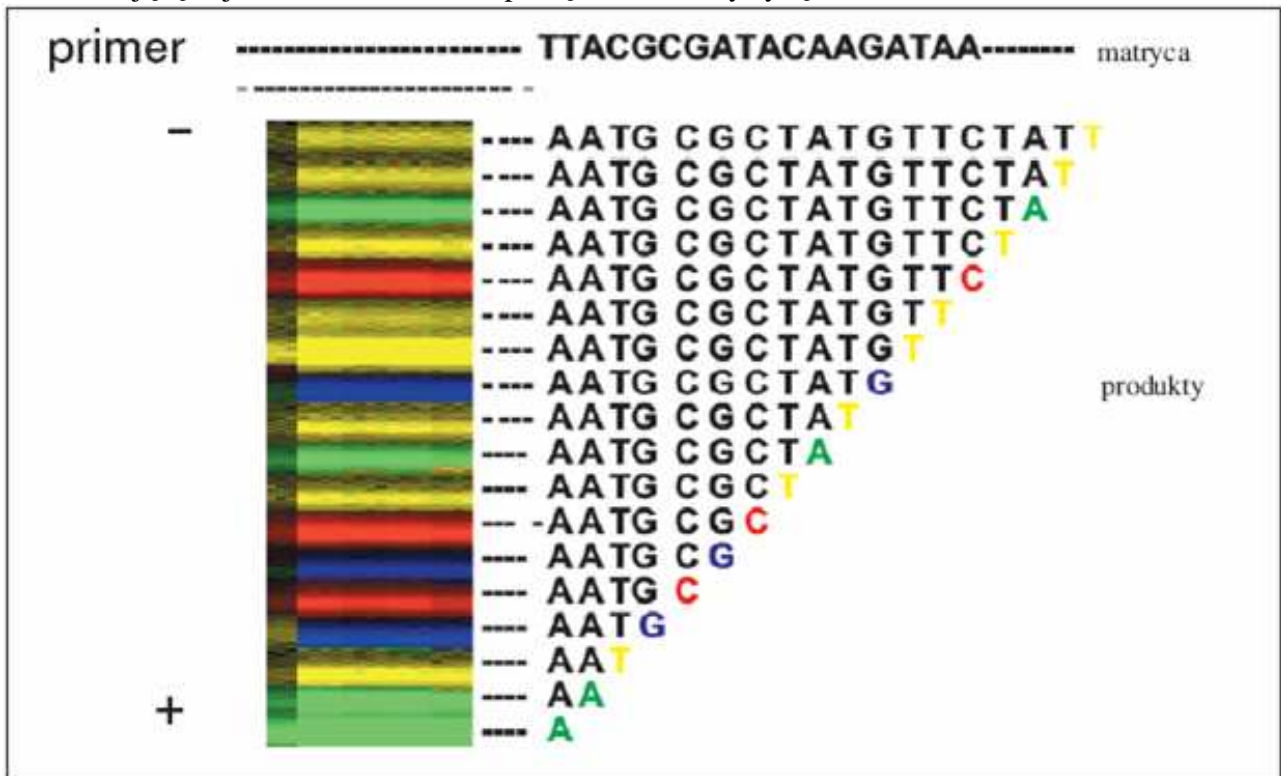
Ryc. 5. Profil elucji DHPLC charakterystyczny (czerwona przerywana linia) dla mutacji A na G w eksonie 19 genu *MLH1*

### DGGE - elektroforeza na żelach z gradientem czynnika denaturującego

W trakcie elektroforezy dwuniciowego DNA w żelu o wzrastającym stężeniu związku denaturującego (formamid, mocznik) niektóre fragmenty DNA ulegają rozdzieleniu na pojedyncze nici (denaturacja) przy niższym, a inne fragmenty przy wyższym stężeniu formamidu.

W momencie rozejścia się na pojedyncze nici ich przemieszczanie w żelu zostaje gwałtownie przyhamowane. Moment denaturacji DNA zależy od jego budowy (składu zasad i długości). Fragmenty zawierające mutacje „zatrzymują się” w żelu na ogół przy innym stężeniu czynnika denaturującego aniżeli prawidłowe. Technika tę cechuje bardzo wysoka, ponad 90% czułość wykrywania mutacji (20). Do wad należy potrzeba elektroforezy w specjalnym aparacie oraz konieczność syntetyzowania dodatkowych starterów bogatych w sekwencje GC (*GC clamp*), co zwiększa znacznie koszty testów.

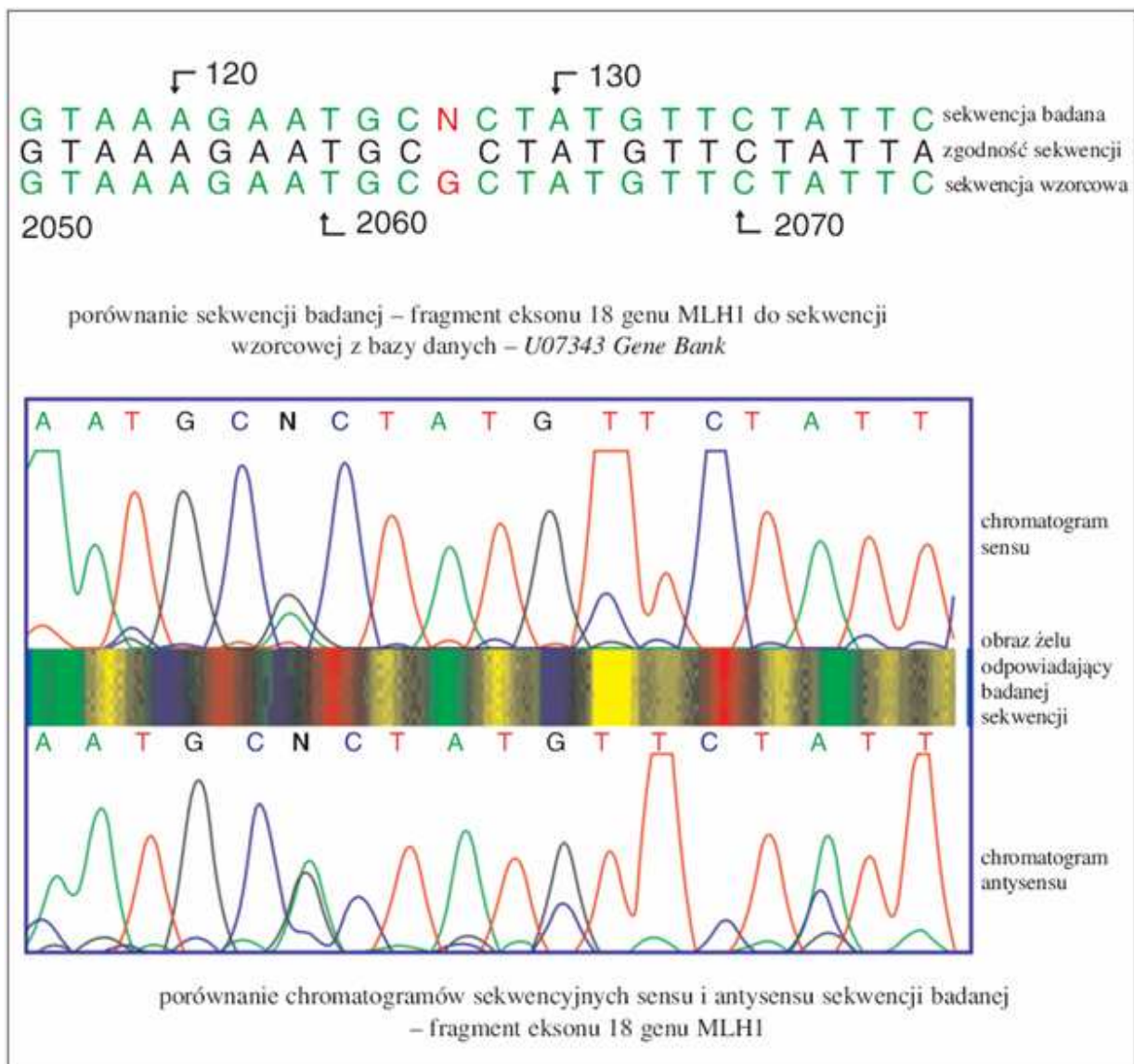
**Ad. 1d.** Sewencjonowanie jest najbardziej czułą techniką wykrywania zmian w materiale genetycznym umożliwiającą jednocześnie ich pełną charakterystykę. W ostatnich latach znaczny



Ryc. 6. Obraz żelu sekwencyjnego - wynik rozdziału asymetrycznego PCR (nukleotyd adenidynowy wyznakowany fluorochromem zielonym; tymidynowy żółtym; guanidynowy niebieskim; cytycynowy czerwonym)

postęp w technologii sekwencjonowania osiągnięto poprzez wprowadzenie automatycznych aparatów do sekwencjonowania, których funkcjonowanie oparte jest o fluorescencję wzbudzaną laserem. Każdy z nukleotydów (A, C, G, T) może być wyznakowany innym fluorochromem (ryc. 6). Najbardziej dogodną techniką jest **sekwencjonowanie metodą cykliczną** (21). W trakcie badania oceniane są sekwencje produktów PCR obu nici DNA. Rzeczywista zmiana w odróżnieniu od artefaktów wykrywana jest w obu niciach (ryc. 7). Procedura sekwencjonowania składa się z kilku etapów:

1. preparatywnego PCR - polegającego na namnożeniu wybranego fragmentu genu przy użyciu pary specyficznych starterów;
2. asymetrycznego PCR - dla każdej próbki amplifikacja osobno z każdym ze starterów z zastosowaniem dideksynukleotydów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi;
3. elektroforezy na denaturującym żelu poliakrylamidowym z równoczesną detekcją i rejestracją przepływających produktów;
4. analizy otrzymanych wyników przy użyciu pakietu programów komputerowych.

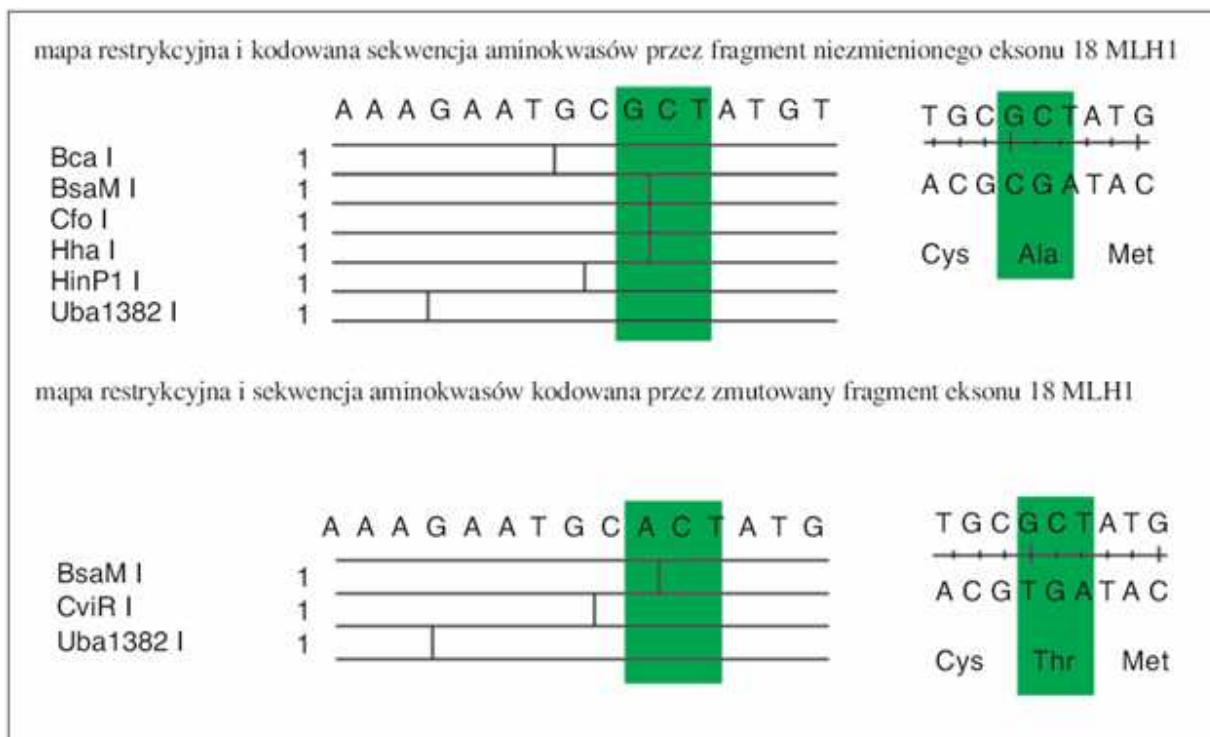


Ryc. 7. Wstępna analiza z wykrytą zmianą w obrębie eksonu 18 genu MLH1

Podczas asymetrycznego PCR powstają wszystkie możliwe, różniące się długością oligonukleotydy komplementarne do matrycy i zawierające na 3'-końcu fluorochrom („zaznaczone kolorem”). Zostają one rozdzielone podczas elektroforezy od najkrótszego po najdłuższy, a kolejność kolorowych nukleotydów odczytana jako sekwencja komplementarna do matrycy. Stwierdzona sekwencja DNA jest później porównywana z sekwencją prawidłową z dostępnych baz danych takich jak GenBank i EMBL. Przez porównanie z sekwencjami prawidłowymi określany jest dokładnie charakter zmiany (ryc. 7 i 8).

Obecnie czołowe firmy oferują sekwenatory umożliwiające jednoczesne sekwencjonowanie 96 próbek w oparciu o elektroforezę kapilarną produktów otrzymanych metodą cykliczną z użyciem dideoksynukleotydów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Postęp w tej dziedzinie polegał w ostatnich latach, nie tylko na zwiększeniu liczby jednocześnie analizowanych próbek, ale na opracowaniu nowych żeli (umożliwiających wielokrotny rozdział na tym samym wypełnieniu kapilary) i „chemii” (mieszaniny złożonej z buforów; substratów, polimerazy i tak zwanych ulepszczy) umożliwiających analizę sekwencji jednego fragmentu długości prawie 1000 zasad.





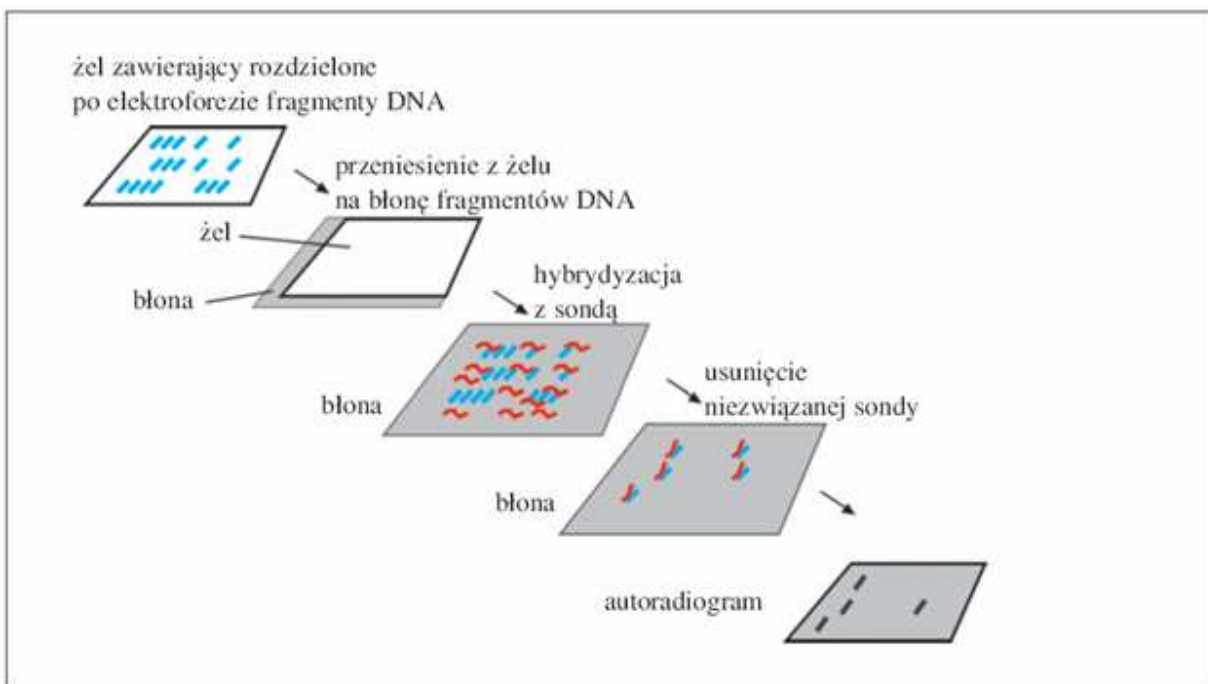
Ryc. 8. Zmiany mapy restrykcyjnej i sekwencji aminokwasów w białku spowodowane mutacją w eksonie 18 genu MLH1. Mutacja prowadzi do utraty miejsc restrykcyjnych dla Bca I, Cfo I, Hha I, HinP1 I oraz pojawienia się miejsca restrykcyjnego dla CviR I, co łatwo można wykorzystać do jej wykrywania

Oferowane są też nowe aparaty *GSFLX machine 2007* oparte o równoczesne sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym przez syntezę równoczesną bardzo wielu stosunkowo krótkich fragmentów DNA (około 200 zasad), wykorzystując pirosekwencjonowanie z detekcją luminescencji powstającej z rozkładu ATP. Aparaty te pozwalają na analizę 100 mln zasad jednego dnia. **Pirosekwencjonowanie** (22) jako matrycę wykorzystuje jednoniciowy fragment DNA, na których przeprowadzana jest synteza nici komplementarnej poprzez dodawanie kolejno czterech różnych trifosforanów deoksynukleotydów (dNTP). Przyłączeniu każdej zasady towarzyszy uwalnianie pirofosforanu, który zostaje przekształcony w ATP przy udziale sulfurylasy i obecnego w mieszaninie adenozy-5'fosfosiarczanu. Powstały ATP wykorzystywany jest przez lucyferazę do przekształcenia lucyferyny w oksylucyferinę. W reakcji tej powstaje światło w ilości odpowiadającej wyprodukowanemu we wcześniejszym etapie pirofosforanowi. Światło to jest rejestrowane przez kamerę CCD i przekształcane do postaci piksu na wykresie. Ten sam schemat reakcji przeprowadzany jest również dla kolejno dodawanych różnych dNTPów. Jeżeli dodawany nukleotyd nie jest komplementarny do matrycy nie następuje włączenie go do nowo syntetyzowanej nici i nie powstaje pirofosforan. Tylko obecność sygnału świetlnego stanowi postawę do zapisu w sekwencji kolejnego dodawanego nukleotydu.

Mutacje w DNA obejmujące miejsca przyłączania starterów lub inne odcinki poza regionami amplifikowanymi nie są wykrywane za pomocą testów DNA opartych o analizy omówione powyżej. Część takich zmian to duże przemieszczenia.

**Ad. 1e.** Jedną z technik, kiedyś powszechnie używaną do wykrywania dużych przemieszczeń opartą o hybrydizację jest opisana po raz pierwszy przez E.M. Southerna w 1975 i odąd zwana metodą Southerna (*Southern blotting*). W tej metodzie genomowe DNA poddaje się trawieniu enzymami restrykcyjnymi by następnie powstałe fragmenty, rozdzielić przy pomocy elektroforezy na żelu agarozowym. W celu uzyskania formy jednoniciowej poddaje się je denaturacji i przenosi na filtr nitrocelulo-

zowy bądź nylonowy. Związany z filtrem jednoniciowy DNA hybryduje z DNA wyznakowanym i komplementarnym do analizowanego fragmentu (sonda). W wersji z użyciem izotopów obraz prążków wywołuje się metodą autoradiografii, przykładając błonę fotograficzną do filtra w celu zidentyfikowania pozycji prążków zajętych przez sondę (ryc. 9). Duże delecje (wypadnięcia fragmentu genu), insercje (wstawienia) oraz inwersje (odwrócenia) bądź translokacje (przeniesienia) zwykle zmieniają pozycje i intensywność prążków (bo zmieniają się odległości pomiędzy miejscami restrykcyjnymi, a więc i długości analizowanych fragmentów). Metoda Southerna jest czaso- i pracochłonna oraz wymaga dużych ilości dobrej jakości DNA (długocząsteczkowego DNA). Doniesienia literaturowe wskazują, że „Southern” może być zastąpiony nową techniką opartą o multipleks PCR z fluorescencyjnymi primerami (23).

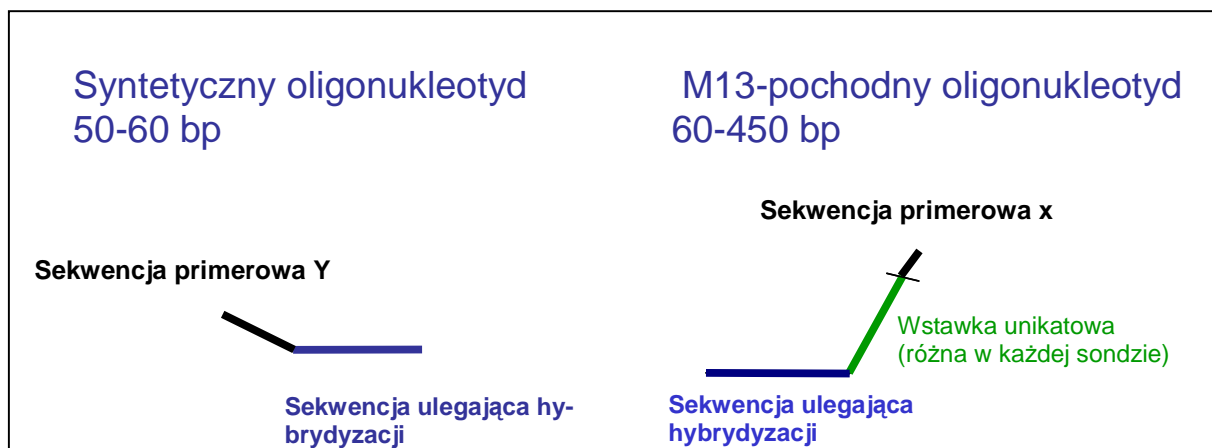


Ryc. 9. Zasada metody Southerna

Technika ta polega na równoczesnej amplifikacji ilościowej wielu fragmentów genu badanego i jednego fragmentu genu odniesienia. Na podstawie zmian stosunków ilościowych poszczególnych fragmentów można wnioskować o delecjach bądź duplikacjach odpowiednich odcinków genów. Nasze doświadczenia wskazują, że ilościowe zmiany często mają w tej technice charakter artefaktów, wynikają np. z różnego stopnia degradacji próbek DNA.

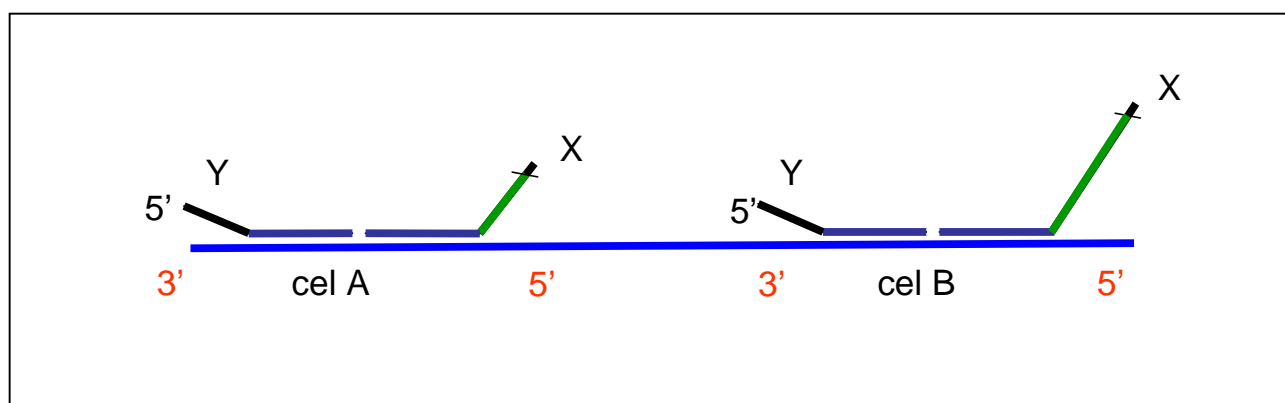
#### Ad. 1f. Zależna od ligacji multitpleksowa amplifikacja sond

Metodą godną polecenia, która niemal całkowicie zastąpiła metodę Southerna, w wykrywania rearanżacji w genach odpowiedzialnych za dziedziczne predyspozycje do nowotworów jest **zależna od ligacji multitpleksowa amplifikacja sond (MLPA - multiplex ligation-dependent probe amplification)** (24). Technika ta w oparciu o reakcję ligacji specyficznych sond i reakcję amplifikacji pozwala na ocenę liczby kopii eksonów. Na jej podstawie można wnioskować o delecjach bądź duplikacjach fragmentów lub całych genów (geny odniesienia jako kontrola). W technice tej stosuje się wiele par sond. Sondy zawierają oprócz sekwencji docelowych komplementarnych do sekwencji eksonowych (sekwencje ulegające hybrydyzacji), sekwencje starterowe, a jedna z każdej pary dodatkowo unikatową sekwencję wstawki (Ryc. 10)



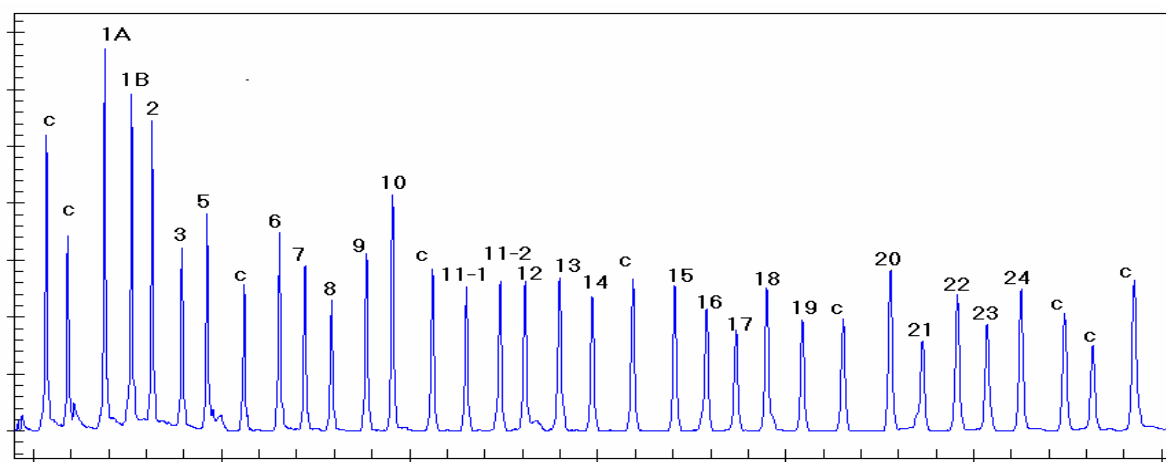
Ryc. 10. Budowa sond w MLPA

Sekwencje hybrydujące każdej pary sond analizowanego regionu genu są skierowane komplementarnie do sąsiadujących ze sobą fragmentów DNA, analizowanego regionu genu i (wtedy może zachodzić ligacja przy w pełni komplementarnej hybrydyzacji) (Ryc. 11)



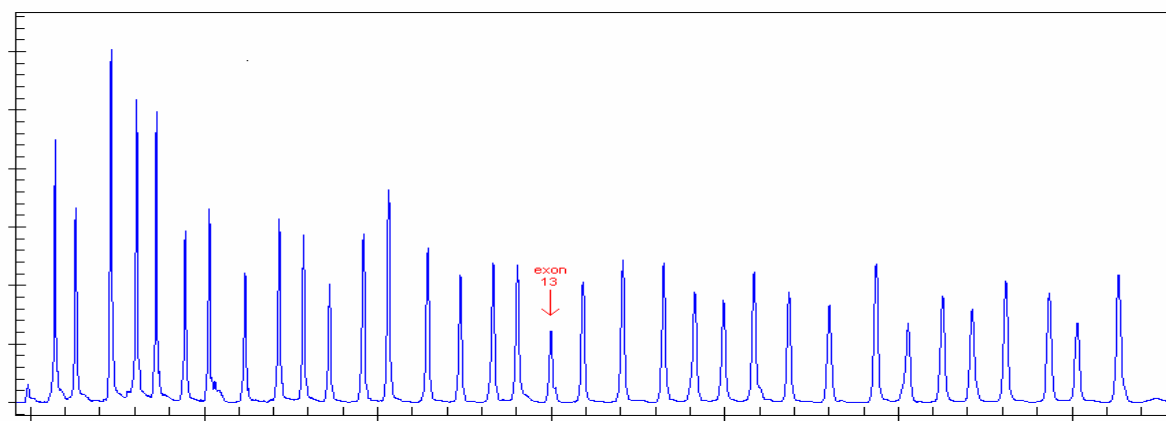
Ryc. 11. Hybrydyzacja i ligacja sond

Po przyłączeniu sond do matrycy następuje ich ligacja, a następnie denaturacja. Oddysocjowany zligowany fragment DNA (z każdej pary jeden) zawierający sekwencję obu starterów zostaje poddany amplifikacji podczas reakcji PCR. Obecność różnej długości wstawek pozwala na rozróżnienie produktów skierowanych na różne cele, a ilość produktu jest proporcjonalna do ilości sekwencji matrycowej. Każdy pik odpowiada produktowi amplifikacji zligowanej specyficznej pary sond (Ryc. 12).



Ryc. 12. Wynik elektroforezy próby kontrolnej

Różnice względne w wysokości bądź powierzchni pików wskazują na zmiany ilościowe (bądź czasami jakościowe) docelowej sekwencji sondy



Ryc. 13. Wynik elektroforezy próby badanej wskazujący na delecję eksonu 13

Zaletą tej techniki jest niewielka ilość DNA wymagana do przeprowadzenia analizy i możliwość zastosowania nawet zdegradowanego materiału genetycznego. Najważniejszymi zaletami metody są prostota wykonania, niska cena i małe wymagania, co do ilości (20ng genomowego DNA) i jakości DNA. Oferowane gotowe zestawy sond dotyczą najważniejszych znanych genów silnie predisponujących do nowotworów takich jak: *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *APC*, *FANCA*, *FANCD2*, *PTCH*, *BMP1A*, *SMAD4*, *TP53*, *CDH1*, *MEN1*, *NF1*, *NF2*, *STK11*, *SMARCB1*, *RBI*, *CDKN2A-CDKN2B*, *WT1*.

## 2. Analizy RNA

Zalety analiz RNA wynikają przede wszystkim z możliwości wykrycia mutacji przy wykonaniu mniejszej liczby reakcji (co wynika z mniejszej długości RNA określonej liczbą zasad w porównaniu do DNA). Jak dotychczas główne wady tych technik obejmują trudności w uzyskiwaniu powtarzalnych wyników, mniejszą stabilność RNA z niektórymi mutacjami oraz kłopoty w interpretacji związane z występowaniem różnych form składania RNA (*altenartive splicing*).

Etapy badania obejmują:

2a / izolację RNA

2b / amplifikację części kodujących genów

2c / wykrywanie zaburzeń w produktach amplifikacji

### **Ad.2a. Izolacja RNA**

W większości pracowni RNA izolowane jest z limfocytów krwi obwodowej. Izolację RNA przeprowadza się w podobny sposób jak izolację DNA. Ze względu na wszechobecność termostabilnych RNaz w tkankach, izolacja RNA wymaga większej staranności. Powszechnie stosowaną metodą izolacji jest procedura P. Chomczynskiego (25) polegająca na lizie komórek w roztworze rodu guanidyny (inhibitor RNaz) i następnie ekstrakcji mieszaniną fenolu i chloroformu. Lekko kwaśny odczyn fenolu sprawia, że wytrąceniu oprócz białek ulega również DNA, który w tych warunkach jest praktycznie nierozpuszczalny.

### **Ad.2b. RT/PCR - Odwrotna transkrypcja z reakcją PCR (*reverse transcription PCR*)**

RNA można przepisywać na cDNA (komplementarne DNA) za pomocą odwrotnej transkryptazy i namnożyć przy pomocy reakcji PCR. RNA nie zawiera intronów więc do powielenia kodującej części wybranego genu wystarcza zwykle zaledwie kilka par starterów. Oceniając tak otrzymane cDNA na zwykłych żelach agarozowych wykryć można zaburzenia RNA polegające na delecjach lub insercjach fragmentów o długości powyżej kilkudziesięciu par zasad.

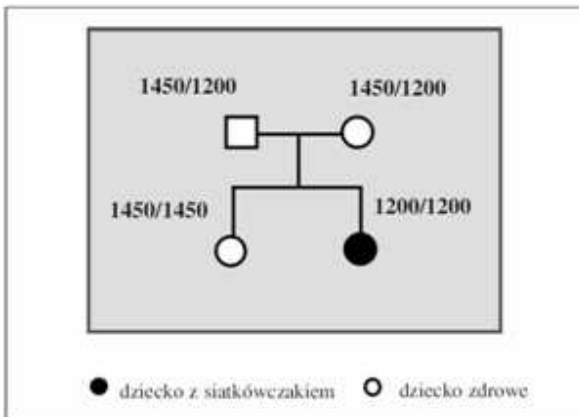
**Ad.2c.** Produkt reakcji RT/PCR może być też badany wszystkimi wcześniej omówionymi technikami oraz przy pomocy **testu syntezy białka in vitro - IVTT (*In Vitro Transcription Translation Assay*) zwanego również PTT (*Protein Truncation Test*)** (26, 27). RT-PCR jest pierwszym etapem w PTT. W PTT jeden starter zawiera nie tylko sekwencje inicjujące przepisywanie na cDNA, ale dodatkowo sekwencje inicjujące translację tj. syntezę in vitro białka na bazie cDNA. Po rozdiale elektroforetycznym i przeniesieniu na błonę nitrocelulozową oceniana jest długość zsyntetyzowanego białka, która jest zmieniona nie tylko wówczas, gdy w obrębie RNA występują duże delecje lub insercje, ale również w przypadkach mutacji nawet pojedynczych nukleotydów prowadzących do powstania sekwencji typu stop kodon (TGA, TAA lub TAG) lub mutacji „splicingowych”. Wadą PTT jest niemożność wykrycia mutacji typu zmiany sensu. Szacuje się, że nawet przy wykorzystywaniu wszystkich znanych testów czułość bezpośredniego wykrywania zmian wynosi obecnie około 70-80 %, głównie ze względu na niemożność rozpoznania zaburzeń w nieznanymi sekwencjach regulujących funkcjonowanie genów. W związku z tym w badaniach rodzin z dziedzicznymi nowotworami stosowane są również techniki pośredniego wykrywania nosicielstwa mutacji.

## **II. Techniki pośredniego wykrywania nosicielstwa mutacji**

### **Analiza sprzężeń (*Linkage analysis*)**

Analiza sprzężeń opiera się na tym, że markery genetyczne znajdujące się na chromosomach blisko siebie dziedziczą się wspólnie w zależności od odległości pomiędzy markerowymi loci - bardzo małe jest prawdopodobieństwo, że dwa loci DNA położone blisko siebie zostaną rozdzielone podczas mejozy w trakcie „crossing over”, natomiast loci znajdujące się na odległych końcach chromosomów są w trakcie mejozy rozdzielane znacznie częściej. Jeżeli w wielu rodzinach z określoną chorobą genetyczną występuje ten sam marker oznacza to, że locus genu odpowiedzialnego za chorobę i marker są sprzężone. Prawdopodobieństwo, że oceniany marker zlokalizowany jest blisko genu dla danej choroby określane jest za pomocą wartości zwanej „lod score” - Z. Z jest  $\log_{10}$  prawdopodobieństwa, że marker i choroba są sprzężone. Jeżeli Z dla sprzężenia badanego markera i choroby wynosi 2, oznacza to, że prawdopodobieństwo przypadkowości sprzężenia markera i genu dla choroby wynosi 1:10<sup>2</sup>, tj. na 1 na 100. Ujemne wartości Z stwierdzane są wówczas, gdy badany marker i gen dla choroby są oddalone na chromosomach. W opracowaniu Gelehrter i Collons (28) można znaleźć szczegółowy opis matematycznych obliczeń Z. Dzięki analizie sprzężeń zlokalizowano geny takie jak BRCA1, BRCA2, MSH2,

MLH1 czy APC. Niestety pełna analiza sprzężeń może być wykorzystana jedynie w wyjątkowych sytuacjach, w których dostępne do badania jest DNA, co najmniej od czterech osób dotkniętych chorobą oraz równocześnie od znacznej liczby osób zdrowych z tej samej rodziny.



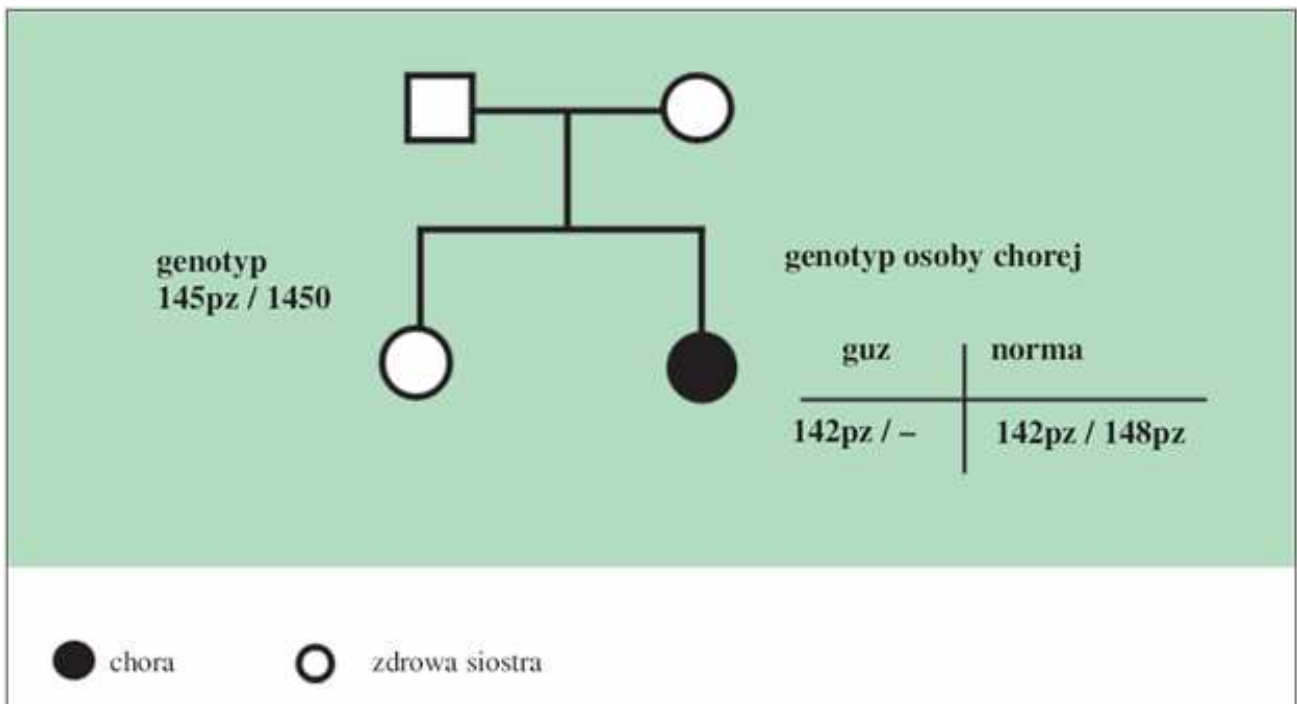
Ryc. 14. Analiza fragmentów wewnętrznych genu Rb. Dziecko jest homozygotą 1200/1200, a jego siostra homozygotą 1450/1450, w związku z czym nie jest on nosicielem zmutowanego genu Rb.

W naszej praktyce w ciągu ponad 10 lat funkcjonowania Onkologicznej Poradni Genetycznej tylko wyjątkowo mieliśmy takie sytuacje. W praktycznym poradnictwie mieliśmy natomiast niejednokrotnie możliwość wykorzystania niepełnej analizy sprzężeń umożliwiającej wykluczenie nosicielstwa zmutowanego genu (ryc.14). Przykłady tego typu badań opisaliśmy we wcześniejszych publikacjach (29,30).

### Znaczenie badań utraty heterozygotyczności w guzie w ocenie nosicielstwa zmutowanych genów

W nowotworach dziedzicznych w guzie często występuje utrata niezmienionego allelu (typu dzikiego) genu odpowiedzialnego za chorobę. Tak, więc poprzez badanie LOH (*loss of heterozygosity*)

można czasami zidentyfikować wariant markera związany z allelem zmutowanym. Umożliwia to wykluczanie nosicielstwa mutacji u krewnych osoby chorej (ryc.15) oraz ustalanie udziału wybranych genów w patogenezie rodzinnych agregacji nowotworów.

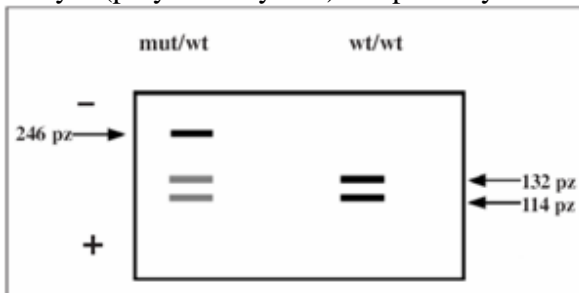


Ryc. 15. Analiza utraty heterozygotyczności markera mikrosatelitarnego w wykluczeniu nosiciela zmutowanego genu MSH2. Siostra osoby z rakiem jelita nie jest nosicielem zmutowanego genu poddanej analizie, ponieważ nie oddziedziczyła wariantu mikrosatelitarnego AFM337yh% o długości 142 pz (par zasad) związanego ze zmutowanym allelem.

## Wykrywanie znanych mutacji

Coraz więcej wiadomo o rodzaju i częstości mutacji predysponujących do niektórych nowotworów dziedzicznych i charakterystycznych dla różnych populacji, w tym o mutacjach powtarzalnych, czyli występujących w wielu rodzinach danej grupy etnicznej. Testy DNA dotyczące wykrywania znanych mutacji nabierają coraz większego znaczenia ze względu na ich niezwykle wysoką efektywność ekonomiczną. Takie geny jak BRCA1, MLH1 i MSH2 czy VHL doczekały się w Polsce opracowań populacyjnych (epidemiologicznych), dzięki którym wiadomo, jakich mutacji i w których miejscach genów szukać (31, 32, 33). Najczęściej stosowane testy DNA wykrywające znane mutacje wykorzystują techniki:

**RFLP/PCR** - (*restriction fragment-length polymorphism /PCR*) - wykrywanie mutacji za pomocą enzymów restrykcyjnych w produktach łańcuchowej reakcji polimeryzacji. Enzymy restrykcyjne, zwane endonukleazami restrykcyjnymi lub krótko restryktazami rozpoznają specyficzne sekwencje zasad w dwuniciowym DNA i rozcinają obie nici dokładnie w określonym miejscu. Dlatego są wykorzystywane do wykrywania mutacji punktowych, małych delecji lub insercji, które prowadzą do utraty lub pojawienia się nowych miejsc restrykcyjnych. Namnożony produkt PCR zawierający zmianę poddaje się trawieniu odpowiednią restryktazą, a następnie rozdziela przy pomocy elektroforezy na żelu agarozowym (przykład - ryc.16) lub poliakrylamidowym.

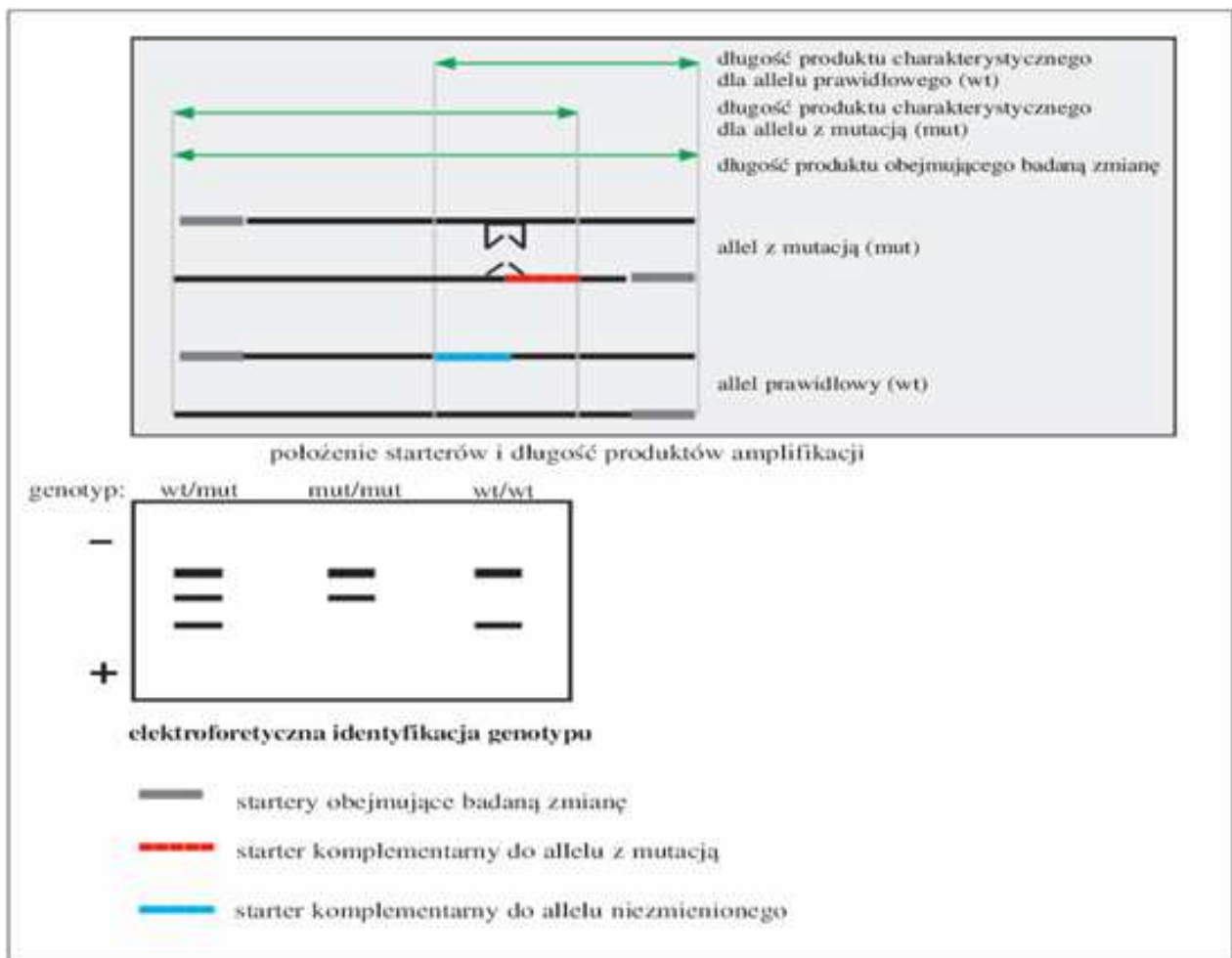


Ryc. 16. Zasada RFLP/PCR. Schematyczny obraz żelu po elektroforezie - tylko wariant genu zawierający G jako zasadę produktu PCR podlega trawieniu przez restryktazą Cfo I w odróżnieniu od formy zmutowanej zawierającej w tym miejscu A

**ASA** - (*allele specific amplification*) - wykrywanie mutacji przy pomocy specyficznych oligonukleotydów. W popularnie używanej wersji tej techniki z użyciem elektroforezy agarozowej oprócz starterów flankujących stosuje się starter w pełni komplementarny do allela z mutacją, lub startery z których jeden jest w pełni komplementarny do allela z mutacją a drugi do allela niezmienionego. Przy tym startery są tak zlokalizowane, że w wyniku PCR powstają różne produkty (różniące się długością) w zależności od genotypu użytej próbki DNA (ryc.17). Nowoczesna wersja tej metody wykorzystująca krótkie sondy fluorescencyjne allelospecyficzne i aparaty „*real time*

*PCR*” (34,35) pozwala na bardzo szybkie badanie wielu próbek DNA.

Technologię matryc (macierzy) z unieruchomionymi na stałej fazie oligonukleotydami można traktować jako współczesną wersję ASA. Niewątpliwą zaletą tej technologii jest daleko idąca automatyzacja i możliwość równoczesnego badania nawet kilku tysięcy znanych mutacji. Dostęp do tej technologii w polskich realiach jest bardzo ograniczony z powodu jej wysokiej ceny.



Ryc. 17. Zasada ASA

### PCR w czasie rzeczywistym (*Real Time PCR*)

Jedną z najnowszych i coraz częściej stosowanych technik w biologii molekularnej jest „Real - Time PCR” pozwalający na monitorowanie ilości produktu reakcji PCR w każdym jej cyklu. Modyfikacja tej techniki polegająca na zastosowaniu fluorescencyjnie znakowanych sond komplementarnych do sekwencji badanego fragmentu DNA znalazła swoje zastosowanie również w identyfikacji znanych zmian genetycznych. Istnieje szereg systemów opartych na tej technice różniących się typem sondy zastosowanym w celu detekcji badanej zmiany. Wśród nich wyróżnia się systemy wykorzystujące sondy typu: *HybProbes*, *TaqMan* i *TaqMan Minor Groove Binder*, *Molecular Beacons*, *Scorpions* czy *SimpleProbes*.

#### Sondy *HybProbes*

System ten zakłada jednoczesne użycie dwóch znakowanych fluorescencyjnie sond, pomiędzy którymi dochodzi do przekazania energii. Jedna z nich znakowana jest za pomocą barwnika pełniącego funkcję donora (3'-Fluorescyna) a druga przy użyciu barwnika stanowiącego funkcję akceptora (5'-Red640 lub 5'\_Red 705). Akceptor jak i donor muszą być w bliskiej odległości - ważne jest, aby sondy zostały zaprojektowane tak, aby hybrydowały z amplifikowaną sekwencją w odległości nie większej niż 1 do 5 nukleotydów. Podczas trwania reakcji PCR na etapie przyłączania starterów dochodzi rów-

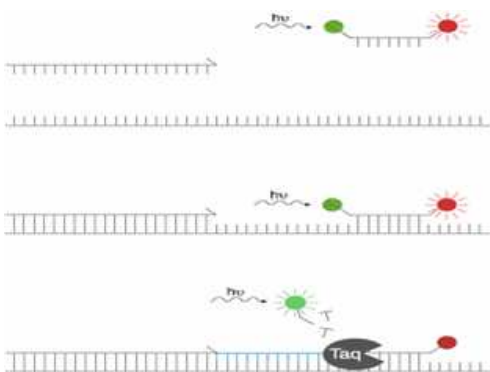


niez do hybrydyzacji sond. Jednoczesne przyłączenie obu sond powoduje przeniesienie energii od donora do akceptora, co skutkuje powstaniem sygnału, którego poziom jest odczytywany przez fluorometr. Podczas etapu wydłużania sondy są oddysocjowane od matrycy DNA, co powoduje zanik fluorescencji. Natężenie sygnału fluorescencyjnego na etapie hybrydyzacji sond jest proporcjonalne do ilości kopii badanej sekwencji DNA na końcu poprzedniego cyklu reakcji PCR. Analiza kolejnych pomiarów pozwala na śledzenie przyrostu amplifikowanego produktu PCR podczas trwania reakcji.

### Sondy *TaqMan*

Stosowana w tym systemie sonda specyficzna dla amplifikowanego fragmentu znakowana jest na 5' końcu barwnikiem reporterowym: FAM (6-karboksyfluoresceina), HEX (heksachloro-6-karboksyfluoresceina), TET (tetrachloro-6-karboksyfluoresceina), lub JOE (2,7-dimetylo-4,5-dichloro-6-karboksyfluoresceina) a na końcu 3' barwnikiem tłumiącym: TAMRA (6-karboksytertrametylorodamina) lub DABCYL (kwas 4-(4'-dimetyloaminofenylazo)-benzoesowy). Bliskość barwnika reporterowego w stosunku do barwnika tłumiącego w obrębie tej samej sondy powoduje, iż fluorescencja jest wygaszana. Podczas reakcji PCR na etapie przyłączania starterów wyznakowana sonda wiąże się specyficznie z matrycą pomiędzy miejscami hybrydyzacji starterów. Jej 3' koniec jest zablokowany co powoduje iż przy następnym etapie jakim jest wydłużanie starterów nie może być ona wydłużana tak jak startery. Zastosowana w tym systemie polimeraza o aktywności 5'-3' dobudowując DNA degraduje sondę, co skutkuje uwolnieniem barwnika reporterowego od barwnika tłumiącego i wzrost fluorescencji. Proces ten zachodzi podczas każdego cyklu powodując narastanie sygnału fluorescencyjnego z poszczególnych cykli, co umożliwi detekcję sygnału w każdym momencie trwania reakcji. Sondy stosowane w tym systemie mają długość od 20 do 40 nukleotydów, liczba par G+C w ich sekwencji zawiera się w przedziale od 40-60%. Sondy nie powinny zawierać powtórzeń pojedynczych nukleotydów szczególnie guaniny. Sekwencja sondy nie powinna być też komplementarna do sekwencji starterów jak i do sekwencji matrycy w miejscu przyłączenia starterów. Ważne jest, aby sonda nie posiadała na 5'-końcu zasady G, ponieważ jej obecność wygasza fluorescencję barwnika reporterowego nawet po odseparowaniu go od barwnika tłumiącego.

Modyfikacją tego systemu jest zastosowanie sondy *TaqMan* typu MGB (Minor Groove Binder), w której do końca 3' przyłączona jest również grupa MGB. Jej funkcja polega na stabilizacji przyłączenia sondy poprzez wpasowanie się do kompleksu powstałego z sondy i matrycowego DNA. Interakcja grupy MGB z kompleksem sonda-matryca podnosi temperaturę topnienia sondy o 15-30°C, co pozwala na zastosowanie sond o znacznie krótszej sekwencji (od 14 do 18 nukleotydów). Jest to korzystne podczas analizy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, ponieważ krótkie sondy łatwiej ulegają destabilizacji pod wpływem zmian nukleotydów występujących w badanej sekwencji.



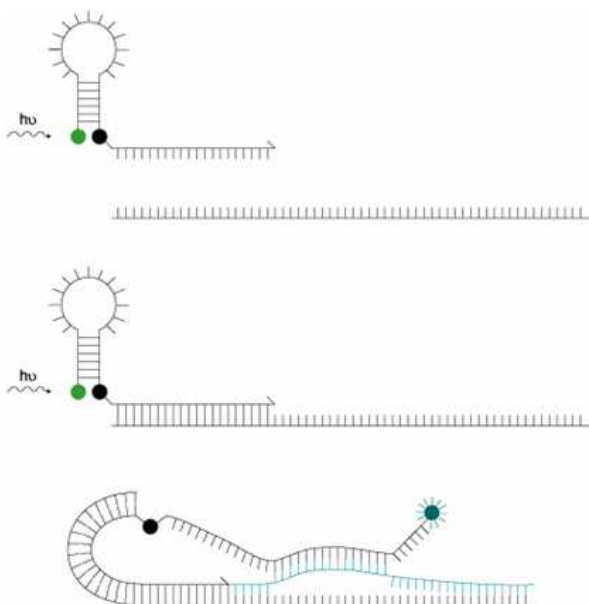
Ryc.18. Zasada działania sondy typu *TaqMan* (wg Haugland R.P. The handbook of Fluorescent Probes and Research products. Ninth Edition. Molecular Probes. Inc [http:// www.probes.com](http://www.probes.com) )

## Sondy *Molecular Beacons*

Wygaszenie fluorescencji może być spowodowane również kształtem sondy. Końce pojedynczej sondy typu *Molecular Beacons* są do siebie komplementarne co sprawia, że w niskich temperaturach hybrydują ze sobą nadając jej charakterystyczny kształt spinki do włosów. Barwniki związane z końcami sondy ( na końcu 5' fluorochrom, na 3' końcu wygaszacz NFQ – DABCYL) pozostają w bliskiej od siebie odległości co powoduje wygaszenie sygnału fluorochromu. Środkowa część sondy tworząca pętlę jest komplementarna do badanego fragmentu DNA. W obecności sekwencji komplementarnej jak i pod wpływem odpowiedniej temperatury sonda zmienia kształt i hybryduje do matrycy. Oddzielony od wygaszacza fluorochrom emituje światło. Na etapie wydłużania sonda jest odłączana od sekwencji matrycowej i fluorescencja zanika. Natężenie emitowanego sygnału na etapie przyłączania sondy jest proporcjonalne do ilości kopii badanego fragmentu DNA na końcu poprzedniego cyklu reakcji PCR.

## Sondy typu Skorpion

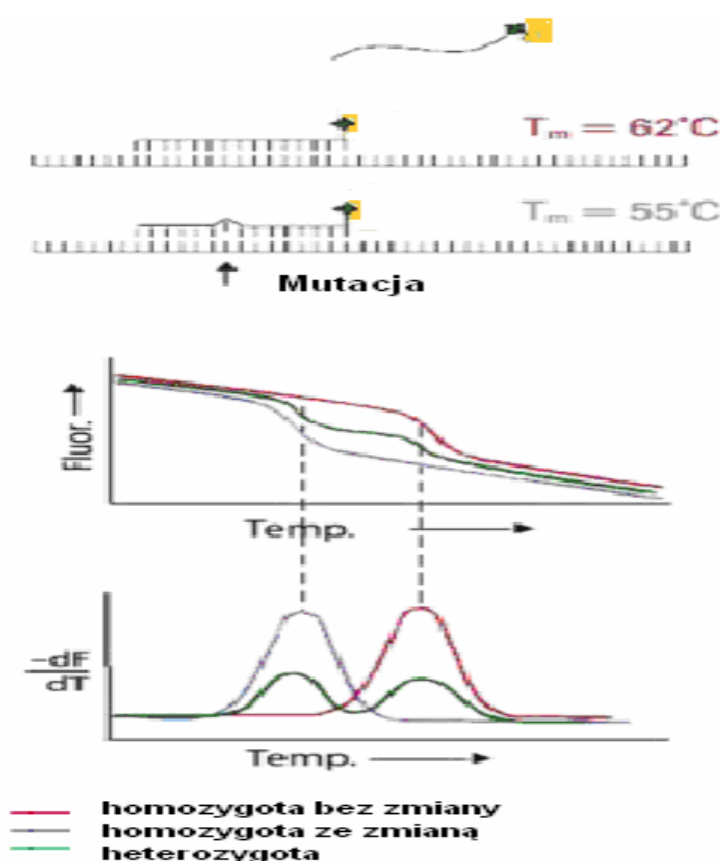
Modyfikacją systemu opartego na sondach *Molecular Beacons* jest zastosowanie sondy w kształcie spinki do włosów w połączeniu ze starterem. Zamknięty kształt sondy powoduje wygaszenie fluorescencji barwników umieszczonych na jej końcach. Po przyłączeniu startera sondy do sekwencji matrycowej a następnie jego wydłużaniu, struktura spinki do włosów ulega otwarciu, uwolniony koniec sondy ulega zagięciu o 180° i komplementarna do badanego fragmentu sekwencja sondy hybryduje do nowo powstającej nici DNA. Oddalenie od siebie barwników powoduje wzrost fluorescencji. Połączenie sondy ze starterem zapobiega niespecyficznemu połączeniu sondy z matrycowym DNA i otwarciu jej struktury przy braku analizowanej sekwencji DNA.



Ryc.19. Zasada działania sondy typu Skorpion (wg Haugland R.P. The handbook of Fluorescent Probes and Research products. Ninth Edition. Molecular Probes. Inc [http:// www.probes.com](http://www.probes.com) )

## Simple Probes

W technice *SimpleProbes* wykorzystuje się krótki fragment jednoniciowego DNA o długości ok. 20-30 nukleotydów (sonda molekularna) o sekwencji komplementarnej do badanego DNA zawierającego zmianę/mutację, wyznakowany na 5' lub 3' końcu barwnikiem fluorescencyjnym (fluoresceiną). Technika ta umożliwia zidentyfikowanie heterozygotycznych oraz homozygotycznych wariantów zmiany/mutacji poprzez pomiar wzrostu fluorescencji wykonywany w gradiencie temperatury. Temperatura topnienia ( $T_m$ ) kompleksu DNA/sonda molekularna jest o kilka do kilkunastu stopni wyższa, gdy sekwencja DNA oraz sondy jest zgodna w stosunku do sytuacji, gdy zgodność ta jest niepełna (np. spowodowana wystąpieniem zmiany/mutacji). Odczyt poziomu fluorescencji podczas podnoszenia temperatury w zakresie 40st-80°C pozwala na zidentyfikowanie konkretnego wariantu badanej zmiany w DNA.



Ryc.20. Zasada działania sondy typu *Simple Probe* (wg Haugland R.P. The handbook of Fluorescent Probes and Research products. Ninth Edition. Molecular Probes. Inc [http:// www.probes.com](http://www.probes.com) )

Systemy oparte za zastosowaniu komplementarnych wyznakowanych fluorescencyjnie sond posiadają szereg zalet. Są nimi: wysoka czułość, krótki czas analizy i pełne zautomatyzowanie analizy oraz zniwelowanie ryzyka kontaminacji poprzez przeprowadzenie wszystkich etapów w zamkniętych dołkach płytki. Wadą techniki jest konieczność projektowania sond dla poszczególnych sekwencji, jak i zbyt mała uniwersalność warunków doświadczalnych.

## **MALDI –TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization Time Of Flight*)**

MALDI-TOF jest jedną z technik spektrofotometrii masowej, która wykorzystywana jest również w detekcji zmian w obrębie badanego fragmentu DNA. Najczęściej stosuje się ją do analizy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów. Analizowane próby nanoszone są na płytki razem z macierzą, a następnie poddawane impulsowi laserowemu wzbudzającemu jony. Cała analiza przeprowadzana jest w warunkach próżniowych, przez co ruch jonów nie jest zakłócany przez zderzenia z cząsteczkami gazów. Zastosowana macierz przejmuje większość energii lasera zabezpieczając w ten sposób materiał genetyczny przed uszkodzeniem. Prędkość przemieszczania się wzbudzonych jonów pochodzących od badanych próbek analizowana jest przez detektor czasu przelotu jonów. Jony pochodzące od większej masy docierają do detektora wolniej niż jony pochodzące od mniejszej masy. Różnice nukleotydowe występujące w badanych próbkach wpływają na ich masę, co pozwala na ich rozróżnienie. Rozdział analizowanych cząsteczek dokonywany jest na podstawie stosunku masy jonów do ich ładunku. Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością i pozwala na szybkie przeprowadzenie analizy, niemniej wciąż jest rzadko stosowaną w laboratoriach ze względu na koszt aparatu, w którym wykonywana jest analiza.

## **Podsumowanie**

W niniejszym opracowaniu przedstawiono podstawowe testy DNA i RNA stosowane w wykrywaniu mutacji konstytucyjnych u osób z wysoką dziedziczną predyspozycją do nowotworów. Od poprzedniego wydania monografii „Nowotwory Dziedziczne” minęło 5 lat. Rozwój i upowszechnianie nowych metod molekularnych przebiega tak szybko, że rozdział „Analizy molekularne DNA i RNA w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów” wcześniejszego wydania prawie całkowicie stracił swoją aktualność. Mało kto dzisiaj używa w codziennej pracy do izolacji DNA czasochłonnej i toksycznej, choć dającej czyste i nie zdegradowane DNA, metody fenolowo-chloroformowej. Zastąpiły ją inne mniej pracochłonne metody, które łatwiej poddają się procesowi automatyzacji, a są oparte na wybiórczym wiązaniu DNA z nośnikiem (złożone chromatograficzne filtry bądź kuleczki magnetyczne) następnie odmyciu zanieczyszczeń i uwolnieniu DNA do roztworu. Pojawienie się w użyciu wielofunkcyjnych robotów laboratoryjnych umożliwiło wykorzystanie ich do izolacji DNA i RNA, normalizacji stężeń (doprowadzenie dożądanego i jednakowego stężenia serii próbek), rozcieńczania badanych próbek, przygotowania reakcji PCR itp. Równoczesny rozwój oprogramowania i komputeryzacja sprawiły, że dzisiaj istnieje możliwość całkowitej automatyzacji procesu bankowania próbek i ich testowania, łącznie z transferem danych i wyników.

W laboratoriach używamy coraz mniej oddzielnych probówek. Na trwałe do użytku weszły płytki o 96 czy nawet 384 dołkach, bo większość analiz wykonujemy w dużych seriach stosując coraz mniejsze objętości odczynników (miniaturyzacja), używając automatycznych dozowników, co przekłada się na coraz mniejsze koszty analizy jednej próbki.

Do lamusa historii odeszły jeszcze tak nie dawno bardzo popularne metody wykrywania nieznanymi mutacji takie jak SSCP, czy metoda DGGE. Natomiast na dobre zadomowiła się w naszych laboratoriach DHPLC stając się obowiązującym standardem we wstępnym wykrywaniu mutacji. Wypieranie niektórych mniej czułych czy bardziej złożonych albo toksycznych metod jest też spowodowane znacznym postępowaniem i zwiększeniem dostępności sekwencjonowania. W przypadku analizy długich fragmentów (około 1000 zasad) bezpośrednie sekwencjonowanie jest dziś najtańszą, najszybszą i najpewniejszą metodą wykrywania nieznanymi mutacji. Obecnie czołowe firmy oferują sekwencjatory umożliwiające jednoczesne sekwencjonowanie 96 próbek w oparciu o elektroforezę kapilarną produktów otrzymanych metodą cykliczną z użyciem dideoksynukleotydów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Postęp w tej dziedzinie polegał, nie tylko na zwiększeniu liczby jednocześnie analizowa-

nych próbek, ale na opracowaniu nowych żeli (umożliwiających wielokrotny rozdział na tym samym wypełnieniu kapilary) i „chemii” (mieszany złożonej z buforów; substratów, polimerazy i tak zwanych „ulepszaczy”) umożliwiających analizę sekwencji jednego fragmentu długości prawie 1000 zasad. Oferowane są też nowe aparaty (GSFLX machine 2007) oparte o równoczesne sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym bardzo wielu stosunkowo krótkich fragmentów DNA. Aparaty te pozwalają na analizę 100 mln zasad jednego dnia i pewnie już niedługo znajdą zastosowanie do szybkiego sekwencjonowania indywidualnego genomu ludzkiego bądź wielu jego rejonów odpowiedzialnych za zwiększone predyspozycje do chorób, w tym również nowotworowych. Próbie czasu nie oparła się ASA w wersji z użyciem elektroforezy agarozowej jest coraz rzadziej używana. Z trudem broni swojej pozycji RFLP/PCR, ze względu na upowszechnienie mniej pracochłonnej i tańszej metody PCR w czasie rzeczywistym zwłaszcza z użyciem sond *TaqMan*, która pozwala na znacznie szybsze analizowanie znanych SNP-ów i mutacji w wielu próbkach równocześnie (płytki na 384 próbek). Dodatkową zaletą tej techniki jest wyeliminowanie możliwości kontaminacji laboratorium produktami reakcji PCR, co jest niezwykle ważne zwłaszcza w laboratoriach diagnostycznych. Niemal całkowicie z użycia wyszła żmudna i pracochłonna metoda Southerna. W wykrywania rearanżacji w genach odpowiedzialnych za dziedziczne predyspozycje do nowotworów i innych chorób zastąpiła ją MLPA. Technika ta w oparciu o reakcję ligacji specyficznych sond i reakcję amplifikacji pozwala na ocenę liczby kopii eksonów. Na jej podstawie można wnioskować o delecjach bądź duplikacjach fragmentów lub całych genów.

#### Piśmiennictwo

1. Lubinski J, Gorski B, Kurzawski G, Jakubowska A, Cybulski C, Suchy J, Debniak T, Grabowska E: Molecular basis of inherited predispositions for tumors. *Acta Biochim Pol* 2002, 49, 571-81.
2. Schubert E.L., Hansen M.F., Strong L.C.: The Retinoblastoma Gene and its Significance. *Annals of Medicine* 1994, 26, 177-184.
3. Gronwald J, Menkiszak J, Toloczko A, Zajaczek S, Kladny J, Kurzawski G, Krzystolik K, Podolski J, Lubinski J.: Hereditary breast cancer. *Pol J Pathol.* 1998, 49, 59-66.
4. Neuman H.P.H., Zbar B.: Renal cysts, renal cancer and von Hippel-Lindau disease. *Kidney International.* 1997, 51, 16-26.
5. Lynch H.T., Smyrk T.: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer* 1996, 78, 1149-1167.
6. Dunlop M.G., Farrington S.M., Carothers A.D., A.H.Wyllie, A.H., Sharp L., J.Burn J., Liu B., Kinzler K.W., Vogelstein B.: Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Molec Genet* 1997, 6, 105-110.
7. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 2766-2770.
8. Nagamine C.M., Chan K, Lau Y.F.C.A.: PCR artifact: Generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet* 1989, 45, 337-339.
9. Cotton R.G.H., Rodrigues N.R., Campbell R.D.: Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, 85, 4397-4401.
10. O'Donovan M.C., Oefner P.J.: Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 1998, 52, 1, 44-49.
11. Myers R.M., Maniatis T., Lerman L.S.: Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 1987, 155, 501-527.
12. Cotton R.G.H.: Current methods of mutation detection. *Mutation Research* 1993, 285, 125-144.
13. White M.B., Carvalho M., Derse D., O'Brien S., Dean M.: Detection single base substitutions as heteroduplex Polymorphisms. *Genomics* 1992, 12, 301-306.
14. Liu W., Smith D. I.: DHPLC used in the detection of germline and somatic mutations. *Nucleic Acids Res* 1998, 26, 6, 1396-1400.
15. Jones A.C. Austin J.: Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 1999, 45, 1133-1140.
16. Arnold N., Gross E.: A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat* 1999, 14, 4, 333-339.
17. Gross E., Arnold N.: A comparison of BRCA1 mutations analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 1999, 105, 72-78.
18. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum Mut* 2001, 17, 439-74.

19. Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, Chlubek D, Scott RJ, Lubinski J. Mutation analysis of MLH1 and MSH2 genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods*. 2002, 51, 89-100.
20. Grompe M.: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics* 1993, 5, 111-117.
21. Rosenthal A., Charnock J.D.S.: New protocols for sequencing with dye terminators. *DNA Seq.* 1992, 3, 61-64.
22. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M., Nyrén P.: Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 1996, 242, 84-90.
23. Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Buisine MP, Puisieux A, Frebourg T. MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* 2002 Feb 1; 62, 3: 848-53.
24. Schouten J.P., McElgunn C.J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G.: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, e57.
25. Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, 156-159.
26. Luce M.C., Marra G., Chauhan D.P., Laghi L., Carethers J.M., Cherian S.P., Hawn M, Binnie C.G., Kam-Morgan L.N.W., Cayouette M.C., Koi M., Boland C.R. : In Vitro Transcription/Translation Assay for the Screening of hMLH1 and hMSH2 Mutations in Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 1995, 109, 1368-1374.
27. Plumer S.J., G.Casey G.: Are we closer to genetic testing for common malignances. *Nature Medicine* 1996, 2, 156-158.
28. Gelehrer T.D., Collons F.C.: Principles of medical genetics. Williams and Wilkins, Baltimore, 1990.
29. Zajączek St., Podolski J., Lubiński J., Rosławska A., Krzystolik Z. Sagan Z.: Technika RFLP-PCR w wykluczeniu nosicielstwa zmutowanego genu Rb. *Klinika Oczna* 1993, 95, 216-218.
30. Zajączek St., Górski B., Dębniak T., Podolski J., Lubiński J., Krzystolik Z., Iwanicka T., Sagan Z.: VNTR-PCR w diagnostyce nosicielstwa genu Rb. *Klinika Oczna* 1994, 96, 290-292.
31. Kurzawski G, Suchy J, Kładny J, Safranow K, Jakubowska A, Elsakov P, Kucinkas V, Gardovski J, Irmejs A, Si-bul H, Huzarski T, Byrski T, Debniak T, Cybulski C, Gronwald J, Oszurek O, Clark J, Gozdz S, Niepsuj S, Slom-ski R, Plawski A, Lacka-Wojciechowska A, Rozmiarek A, Fiszer-Maliszewska L, Bebenek M, Sorokin D, Stawic-ka M, Godlewski D, Richter P, Brozek I, Wysocka B, Jawien A, Banaszkiwicz Z, Kowalczyk J, Czudowska D, Goretzki PE, Moeslein G, Lubinski J.: Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum in HNPCC families from Poland and the Baltic States. *J Med Genet.* 2002, 39, E65.
32. Cybulski C, Krzystolik K, Murgia A, Gorski B, Debniak T, Jakubowska A, Martella M, Kurzawski G, Prost M, Kojder I, Limon J, Nowacki P, Sagan L, Bialas B, Kaluza J, Zdunek M, Omulecka A, Jaskolski D, Kostyk E, Ko-raszewska-Matuszewska B, Haus O, Janiszewska H, Pecold K, Starzycka M, Slomski R, Cwirko M, Sikorski A, Gliniewicz B, Cyrylowski L, Fiszer-Maliszewska L, Gronwald J, Toloczko-Grabarek A, Zajaczek S, Lubinski J.: Germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in pa-tients with deletions of the entire VHL gene. *J Med Genet.* 2002, 39, E38.
33. Gorski B, Byrski T, Huzarski T, Jakubowska A, Menkiszak J, Gronwald J, Pluzanska A, Bebenek M, Fischer-Maliszewska L, Grzybowska E, Narod SA, Lubinski J.: Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000, 66, 1963-8.
34. Heied CA, Stevens J, LivakKJ, Williams PM.: Real time PCR. *Genome Res.* 1996, 6, 986-94.
35. Matsubara Y, Fujii K, Rinaldo P, Narisawa K.: A fluorogenic allele-specific amplification method for DNA-based screening for inherited metabolic disorders. *Acta Paediatr Suppl.* 1999, 88, 65-8.

## Test *MSH2* i *MLH1*

Wykonanie testów DNA jest wskazane w rodzinach spełniających, co najmniej kryteria podejrzenia o HNPCC. Po wykluczeniu FAP (występowanie cech charakterystycznych dla FAP to: polipowatość jelit, przerost nabłonka barwnikowego siatkówki oka, występowanie zmian torbielowatostniakowych kości twarzoczaszki i desmoidów), jeżeli dysponujemy tkanką z guza, należy wykonać immunohistochemiczną ocenę ekspresji białek MLH1, MSH2, MSH6 w tkance nowotworowej, ponieważ badanie to może zawęzić dalsze postępowanie do poszukiwania mutacji w obrębie jednego genu (brak ekspresji - może wskazywać na zmutowany gen!).

Wieloletnie wieloośrodkowe badania doprowadziły do scharakteryzowania częstości i rodzajów występujących w Polsce mutacji genów *MSH2* i *MLH1* (1). Najważniejsze ustalenia przydatne w opracowaniu testu to:

- najczęstszą przyczyną zespołu Lyncha w Polsce są mutacje w obrębie *MSH2* i *MLH1*, które stanowią 90% wszystkich mutacji związanych z tym zespołem
- mutacje wykrywane testem MLPA stanowią około 10% wszystkich mutacji
- mutacje powtarzalne występują u ponad 60% wszystkich rodzin z mutacjami.

Biorąc pod uwagę te wytyczne oraz koszty analiz, w następnej kolejności należy wykonać badanie MLPA dla *MSH2*, *MLH1*. W przypadku wyniku negatywnego następnym krokiem powinno być wykonanie badania najczęstszych charakterystycznych dla populacji polskiej mutacji w *MSH2* i *MLH1* w DNA z krwi obwodowej pacjenta. Ostatnim etapem wykrywania mutacji jest analiza wszystkich fragmentów kodujących genów za pomocą DHPLC (2) i sekwencjonowanie fragmentów, których chromatogramy wskazują na obecność heterodupleksów.

### Piśmiennictwo:

1. Kurzawski G, Suchy J, Lener M, Kłujso-Grabowska E, Kładny J, Safranow K, Jakubowska K, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Dębniak T, Cybulski C, Gronwald J, Oszurek O, Oszutowska D, Kowalska E, Góźdz S, Niepsuj S, Słomski R, Pławski A, Łącka-Wojciechowska A, Rozmiarek A, Fiszer-Maliszewska Ł, Bębenek M, Sorokin D, Sasiadek MM, Stembalska A, Grzebieniak Z, Kilar E, Stawicka M, Godlewski D, Richter P, Brożek I, Wysocka B, Limon J, Jawień A, Banaszkiwicz Z, Janiszewska H, Kowalczyk J, Czudowska D, Scott RJ, Lubiński J. Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). Clin Genet 2006; 69: 40-47.
2. Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, Chlubek D, Scott RJ, Lubinski J. Mutation analysis of MLH1 and MSH2 genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. J Biochem Biophys Methods. 2002, 51, 89-100.

## Test BRCA1

Sklonowany w roku 1994 gen BRCA1 zlokalizowany na chromosomie 17q21 jest genem bardzo rozległym - rozciąga się na prawie 100 kbp genomowego DNA, jego mRNA posiada 7,8 kbp długości, 24 eksony, a jego białko składa się z 1836 aminokwasów (1, 2). Spektrum mutacji BRCA1 jest bardzo duże i mogą one występować wzdłuż całego genu. Gen BRCA1 bardzo rzadko podlega mutacjom „de novo” i to jest najprawdopodobniej jedną z głównych przyczyn „efektu założyciela” powodującego, że w populacjach o dużym poziomie homogenności etnicznej zaledwie kilka mutacji stanowi większość obserwowanych uszkodzeń genu BRCA1. W Polsce zjawisko to po raz pierwszy zaobserwowano w naszym Ośrodku (3), a niezależnie, jednak nieco później i na mniejszym materiale, w Gliwicach (4). Mutacje genu BRCA1 w polskich rodzinach opisano również w innych pracach, jednak z doniesień tych nie wynikało, że zaledwie kilka zmian stanowi zdecydowaną większość zaburzeń konstytucyjnych występujących w Polsce (5, 6). W przeprowadzonych w Szczecinie w latach 1996-1999 badaniach 66 rodzin z silną agregacją raków piersi/jajnika wykryto 35 mutacji konstytucyjnych BRCA1, z których 5382insC, C61G i 4153delA stwierdzono odpowiednio w 18, 7 i 4 przypadkach (3). Dalsze badania przeprowadzone na reprezentatywnej dla wszystkich regionów w Polsce serii 200 rodzin z co najmniej 3 rakami piersi/jajnika wykazały, że mutacje konstytucyjne genu BRCA1 (badane sekwencjonowaniem oraz technikami „Long PCR” i „Southern-RFLP”) są przyczyną 64% (128/200) tych agregacji, a około 90% z nich stanowi jedna z trzech mutacji 5382insC, C61G i 4153delA występujące w stosunku około 6:2:1 (7) (tabela 1, 2).

Istniejąca sytuacja powoduje, że u pacjentów polskiego pochodzenia testowanie w celu wykrycia nosicieli mutacji BRCA1 jest niezwykle efektywne. Opracowany w naszym Ośrodku test DNA izolowanego z krwi obwodowej oparty o „multiplex PCR” wykrywa w prosty, szybki i tani sposób (400 zł wynosi w Polsce cena testu DNA łącznie z poradą specjalisty genetyka-onkologa) 90% polskich rodzin z mutacjami BRCA1 związanych z wysokim ryzykiem raka piersi/jajnika (opracowanie patentowe nr P-335917). Specyficzność testu jest praktycznie 100% (brak wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych) zwłaszcza jeżeli wynik testu oparty jest o analizę z dwóch niezależnych pobrań krwi. W rodzinach z co najmniej jedną osobą z wykrytą mutacją BRCA1 wykluczenie/potwierdzenie nosicielstwa mutacji można ocenić praktycznie biorąc ze 100% pewnością. W przeprowadzonych w naszym Ośrodku testach u około 500 kolejnych pacjentek z rodzin z rakiem piersi zdiagnozowanym przed 50 rokiem życia mutacje BRCA1 wykryto w 9% przypadków. W podobnych badaniach u około 500 kolejnych pacjentek z rakiem jajnika niezależnie od wieku zdiagnozowania tego nowotworu, mutację BRCA1 stwierdzono w 14% przypadków. W koordynowanej przez nasz Ośrodek akcji Stowarzyszenia „Różowa Wstążka” promowanej przez czasopismo dla kobiet „Twój Styl” testy BRCA1 wykonano u 5000 kobiet wykrywając mutacje u 4% pacjentek zdrowych, u których wśród krewnych I° lub II° stwierdzono raka piersi rozpoznanego przed 50 r.ż. lub raka jajnika niezależnie od wieku zdiagnozowania. Akcję przeprowadzono na terenie całego kraju, tak więc można przyjąć, że mimo istniejących prawdopodobnie regionalnych różnic, dla wszystkich Polek wskazaniem do testu BRCA1 powinno być stwierdzenie wśród krewnych I° lub II° zarówno:

- a. cech rodowodowo-klinicznych dziedzicznego raka piersi/jajnika (wg kryteriów podanych w rozdziale o tych zespołach), jak i:
- b. stwierdzenie zachorowania na raka piersi przed 50 r.ż. lub raka jajnika w dowolnym wieku.

Inne zasady, które konieczne należy przestrzegać przy wykonywaniu testów BRCA1:

- a. pełnoletniość osoby testowanej
- b. wykonywanie analiz DNA z dwóch niezależnych pobrań krwi przez akredytowaną pracownię



- c. przeprowadzenie specjalistycznej konsultacji przez genetyka-onkologa zarówno przed jak i po analizie DNA.

Dzięki niezwykłej efektywności zarówno medycznej jak i ekonomicznej DNA w naszym Ośrodku do końca września 2007 roku wykryliśmy 3930 nosicielek mutacji BRCA1 i jest to według naszych danych, wśród pracowni diagnozujących zaburzenia tego genu, liczba największa na świecie. Można przyjąć szacunkowo, że w Polsce żyje około 100.000 nosicielek i tyle samo nosicieli mutacji genu BRCA1.

#### **Piśmiennictwo**

1. Chamberlain JS, Boehnke M, Frank TS, et al.: BRCA1 maps proximal to D178579 on chromosome 17q21 by genetic analysis. *Am J Hum Genet* 1993, 52, 792-798.
2. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994, 266, 66-71.
3. Górski B, Byrski T, Huzarski T, et al.: Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000, 66, 1963-1968.
4. Grzybowska E, Zientek H, Jasińska A, et al.: High frequency of recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Polish families with breast and ovarian cancer. *Hum Mut* 2000, 16, 482-490.
5. Sobczak K., Kozłowski P., Napierała M, i wsp.: Novel BRCA1 mutations and more frequent intron-20 alteration found among 236 women from Western Poland. *Oncogene* 1997 Oct 9, 15, 1773-1779.
6. Van der Looij M., Wysocka B., Brożek I. i wsp.: Founder BRCA1 mutation and two novel germline BRCA2 mutations in breast and/or ovarian cancer families from North-Eastern Poland. *Hum Mut* 2000, Mutation in Brief#320.
7. Górski B., Jakubowska A., Mędrak K. i wsp.: BRCA1/BRCA2 mutation spectrum in Polish families with strong aggregation of breast/ovarian cancers. Konferencja „Nowotwory dziedziczne – profilaktyka, diagnostyka, leczenie” Międzyzdroje 23-24 maja 2002, streszczenie s. 36.

# Testy DNA średniego i niskiego ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe

Jak dotąd nie ustalono efektywności medycznej i ekonomicznej dla testów wykrywających zmiany DNA nieznacznie podwyższające ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe. Niemniej jednak wykonywanie tych testów jako opcji postępowania diagnostycznego należy rozważyć u wszystkich dorosłych niezależnie od nowotworowego wywiadu rodzinnego.

## 1. Test oparty o wykrywanie mutacji 3020insC genu NOD2

Zmiana 3020insC w obrębie genu NOD2 zwiększa ryzyko zachorowania na:

- raka piersi (DCIS w wieku poniżej 50 r.ż.) ok. 5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 8% wszystkich raków piersi
- raka jelita grubego ponad 2-krotnie w wieku powyżej 60 r.ż. - mutacja ta występuje ok. 15% wszystkich raków jelita grubego
- raka płuc ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje ok. 12% wszystkich raków płuc
- raka jajnika ok. 1,5-krotnie - mutacja ta występuje ok. 11% wszystkich raków jajnika (1).

Zalecenia dla nosicieli zmiany 3020insC w obrębie genu NOD2 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi
- badania lekarskie piersi od 20 r.ż. 1 x 6 miesięcy
- USG piersi od 20 r.ż. 1 x rok
- mammografia od 35 r.ż. 1 x rok naprzemiennie z USG piersi
- USG dopochwowe narządu rodno od 45 r.ż. 1 x rok
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż. co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce

Zalecenia dla mężczyzn:

- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż. co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce

## 2. Test oparty o wykrywanie mutacji 1100delC, IVS2+1G>A, del5395, I157T genu CHEK2

Zmiany skracające białko CHEK2 (1100delC i IVS2+1G>A, del5395) zwiększają ryzyko zachorowania na:

- raka piersi (częściej rak zrazikowy) ok. 2,4-krotnie – mutacje te występują w ok. 2,5% wszystkich raków piersi
- raka prostaty ok. 2,3-krotnie - mutacje te występują w ok. 2,5% wszystkich raków prostaty oraz ok. 5% rodzinnych raków prostaty; ryzyko raka prostaty jest zwiększone około 5-krotnie jeśli w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I stopnia

- raka brodawkowego tarczycy - ok. 5-krotnie – mutacje te występują w ok. 4% wszystkich raków brodawkowatych tarczycy (2,3,4).

Zmiana typu "missense" I157T w obrębie genu CHEK2 zwiększa ryzyko zachorowania na:

- raka piersi ok. 1,5-krotnie – mutacja ta występuje w ok. 7% raków piersi
- raka prostaty ok. 1.6-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 8% wszystkich raków prostaty oraz ok. 12% rodzinnych raków prostaty; ryzyko raka prostaty jest zwiększone około 3-krotnie gdy w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I stopnia
- raka brodawkowego tarczycy ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 9% raków tarczycy
- raka nerki ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 10% raków nerki
- raka jelita grubego ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 10% raków jelita grubego (2,3,4).

Zalecenia dla nosicieli zmian skracających białko CHEK2 (1100delC i IVS2+1G>A, del5395) proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi
- badania lekarskie piersi od 25 r.ż 1 x 6 miesięcy
- USG piersi od 25 r.ż 1 x rok
- mammografia od 35 r.ż 1 x rok naprzemiennie z USG piersi
- USG tarczycy od 20 r.ż 1 x rok

Zalecenia dla mężczyzn:

- badanie palpacyjne prostaty, PSA od 50 r.ż 1 x rok
- do rozważenia biopsja saturacyjna po 60 r.ż - tylko jeśli w rodowodzie jest rak prostaty wśród krewnych I stopnia !!!!

Zalecenia dla nosicieli zmiany I157T w obrębie genu CHEK2 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi
- badania lekarskie piersi od 40 r.ż 1 x 6 miesięcy
- USG piersi od 40 r.ż 1 x rok
- rezonans magnetyczny piersi ewentualnie mammografia od 40 r.ż 1 x rok naprzemiennie z USG piersi
- USG dopochwowe narządu rodowego od 25 r.ż 1 x rok
- USG jamy brzusznej od 40 r.ż 1 x rok ze szczególnym zwróceniem uwagi na nerki
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych
- USG tarczycy od 20 r.ż 1 x rok

Zalecenia dla mężczyzn :

- USG jamy brzusznej od 40 r.ż 1 x rok ze szczególnym zwróceniem uwagi na nerki
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych
- badanie palpacyjne prostaty, PSA od 50 r.ż 1 x rok

- do rozważenia biopsja saturacyjna prostaty po 60 r.ż - tylko jeśli w rodowodzie jest rak prostaty wśród krewnych I stopnia !!!!

### **3. Test oparty o wykrywanie mutacji 657del5 genu NBS1**

Zmiana 657del5 w obrębie genu NBS1 zwiększa ryzyko zachorowania na:

- raka piersi ok. 2-krotnie; mutacja ta występuje w ok. 1% wszystkich raków piersi
- raka prostaty ok. 4-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 3% wszystkich raków prostaty i ok. 9% rodzinnych raków prostaty; ryzyko raka prostaty jest zwiększone około 15-krotnie jeśli w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I stopnia (5)

Zalecenia dla nosicieli zmiany 657del5 w obrębie genu NBS1 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi
- badania lekarskie piersi od 30 r.ż 1 x 6 miesięcy
- USG piersi od 30 r.ż 1 x rok
- mammografia od 35 r.ż 1 x rok naprzemiennie z USG piersi

Zalecenia dla mężczyzn:

- badanie palpacyjne prostaty, PSA od 50 r.ż 1 x rok
- do rozważenia biopsja saturacyjna po 60 r.ż - tylko jeśli w rodowodzie jest rak prostaty wśród krewnych I stopnia !!!!

### **4. Test oparty o wykrywanie zmiany A148T genu CDKN2A (p16)**

Zmiana A148T w obrębie genu CDKN2A (p16) zwiększa ryzyko zachorowania na:

- czerniaka złośliwego ok. 2-krotnie - mutacja występuje w około 7% wszystkich czerniaków złośliwych
- raka piersi (częściej DCIS) poniżej 50. roku życia ok. 1,5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 5% raków piersi poniżej 50. roku życia
- raka płuc ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 7% wszystkich raków płuc
- raka jelita grubego ok. 1,5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 5% wszystkich raków jelita grubego (6, 7, 8)

Zalecenia dla nosicieli zmiany A148T w obrębie genu CDKN2A proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi
- badania lekarskie piersi od 20 r.ż 1 x 6 miesięcy
- USG piersi od 20 r.ż 1 x rok
- mammografia od 35 r.ż 1 x rok naprzemiennie z USG piersi
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce
- unikanie nadmiernej ekspozycji na słońce/inne źródła promieniowania UV; stosowanie filtrów przeciwsłonecznych o wysokim (30 i więcej) współczynniku fotoprotekcji

- w przypadku stwierdzenia znamion wykazujących następujące zaburzenia: powiększanie się, zmiana zabarwienia, świąd, obwódka zapalna, sączenie, krwawienie- natychmiastowa konsultacja u dermatologa

#### Zalecenia dla mężczyzn:

- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce
- unikanie nadmiernej ekspozycji na słońce/inne źródła promieniowania UV; stosowanie filtrów przeciwsłonecznych o wysokim (30 i więcej) współczynniku fotoprotekcji
- w przypadku stwierdzenia znamion wykazujących następujące zaburzenia: powiększanie się, zmiana zabarwienia, świąd, obwódka zapalna, sączenie, krwawienie- natychmiastowa konsultacja u dermatologa

#### **5. Test oparty o wykrywanie zmian C142G, G355T, G4326C genu CYP1B1**

Homozygotyczne nosicielstwo zmian C142G, G355T, G4326C (homozygoty GTC) w obrębie genu CYP1B1 zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi ok. 2-krotnie i występuje w ok. 12% wszystkich raków (9).

Zalecenia dla nosicielek homozygotycznego genotypu GTC w obrębie genu CYP1B1 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

- systematyczna samokontrola piersi
- badanie lekarskie piersi od 25 r.ż 1 x 6 miesięcy
- USG piersi od 25 r.ż 1 x rok
- rezonans magnetyczny piersi ewentualnie mammografia od 25 - 30 r.ż 1 x rok naprzemiennie z USG piersi

#### **6. Test oparty o wykrywanie zmiany C5972T genu BRCA2**

Zmiana C5972T zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi (DCIS poniżej 50. roku życia) ok. 3-krotnie; homozygotyczne nosicielstwo tej zmiany (homozygoty TT) zwiększa ryzyko raka piersi poniżej 50. roku życia ok. 5-krotnie; zmiana ta występuje w ok. 6% raków piersi poniżej 50. roku życia (10).

Zalecenia dla nosicielek zmiany C5972T genu BRCA2 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

- systematyczna samokontrola piersi
- badania lekarskie piersi od 25 r.ż 1 x 6 miesięcy
- USG piersi od 25 r.ż 1 x rok
- mammografia od 35 r.ż 1 x rok naprzemiennie z USG piersi

#### **7. Test oparty o badanie nosicielstwa mutacji C61G oraz 4153delA genu BRCA1 u mężczyzn**

Zmiany C61G oraz 4153delA genu BRCA1 u mężczyzn zwiększają ryzyko zachorowania na raka prostaty ok. 3,6-krotnie - mutacje te występują w ok. 0,4% wszystkich raków prostaty; ryzyko raka prostaty u nosicieli tych zmian jest zwiększone około 12-krotnie gdy w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I stopnia (11).

Zalecenia dla nosicieli mutacji C61G oraz 4153delA genu BRCA1 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

- badanie urologiczne, PSA od 50 r.ż 1 x 1 rok
- do rozważenia biopsja saturacyjna prostaty po 60 r.ż - tylko jeśli w rodowodzie jest rak prostaty wśród krewnych I stopnia !!!!

**Piśmiennictwo**

1. G. Kurzawski i wsp.: The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 2004, 64: 1604-6; J. Lubiński i wsp.: The 3020insC Allele of NOD2 Predisposes to Cancers of Multiple Organs, *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2005; 3; 59-63.
2. Cybulski C i wsp. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 1131-5, C. Cybulski i wsp.: A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 2004, 64: 2677-9.
3. Cybulski C i wsp. A large germline deletion in the CHEK2 gene is associated with an increased risk of prostate cancer. *J Med Genet.* 2006, 43: 863-6.
4. Cybulski C i wsp. A deletion in CHEK2 of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 102: 119-22.
5. Cybulski T i wsp.: NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 2004, 64: 1215-9.
6. Dębniak T i wsp.: CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res.* 2005, 65: 835-9.
7. Dębniak T i wsp.: A Common Variant of CDKN2A (p16) Predisposes to Breast Cancer. *J Med Genet.* 2005; 42: 763-5.
8. Dębniak T i wsp.: CDKN2A common variant and multi-organ cancer risk-a population-based study. *Int J Cancer* 2006, 118 (12): 3180-2.
9. Matyjasik J i wsp.: CYP1B1 and predisposition to breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2007, Apr 26; Epub.
10. Górski B i wsp. A common missense variant in BRCA2 predisposes to early onset breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005; 7 (6): 1023-7.
11. Cybulski C i wsp. BRCA1 mutations and prostate cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2007, w druku.