

POLIMORFIZM GENÓW NAPRAWY DWUNICIOWYCH PĘKNIĘĆ DNA W RAKU PIERSI*

GENE'S POLYMORPHISM OF DNA DOUBLE-STRAND BREAKS REPAIR IN BREAST CANCER

Ewelina SYNOWIEC, Anna MERECZ, Renata KRUPA, Katarzyna WOŹNIAK

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet. W ciągu ostatnich kilku lat w Polsce zachorowalność wzrosła o około 4 – 5%. Rak ten jest także przyczyną największej liczby zgonów wywołanych przez nowotwory złośliwe. Etiologia większości przypadków raka piersi nie jest możliwa do ustalenia. Czynnikiem ryzyka o największym znaczeniu są wiek i występowanie raka piersi u krewnych I i/lub II stopnia. Mutacje germinalne w dwóch głównych genach wysokiej penetracji, *BRCA1* i *BRCA2*, odpowiedzialne są za wysokie ryzyko rozwoju raka piersi, jednakże stanowią one mniej niż 5% wszystkich przypadków tego nowotworu. Rak piersi może być wynikiem niestabilności genomowej wynikającej z obecności dwuniciowych pęknięć DNA. Dwuniciowe pęknięcia DNA należą do najgroźniejszych uszkodzeń DNA. Nienaprawione mogą powodować amplifikację lub utratę materiału genetycznego, co z kolei może prowadzić do transformacji nowotworowej przez aktywację onkogenów, inaktywację genów supresorowych lub utratę heterozygotyczności. Komórki nabłonkowe gruczołu piersiowego, ze względu na ekspozycję na estrogen, są szczególnie narażone na indukcję różnych uszkodzeń DNA, w tym także pęknięć dwuniciowych. Pęknięcia te są zwykle naprawiane z wysoką dokładnością na drodze naprawy przez rekombinację homologiczną (HRR) albo przez niehomologiczne łączenie końców DNA (NHEJ). Zaburzenia w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA zwiększają ryzyko raka piersi, zarówno występującego rodzinnie, jak i sporadycznie. Zmiany w efektywności procesów naprawczych DNA wynikające z naturalnie występujących polimorfizmów również mogą wpływać na ryzyko raka piersi. Polimorficzne geny naprawy DNA zaliczane są w większości do genów niskiej penetracji, co oznacza, że produkt pojedynczego genu najczęściej nieznacznie wpływa na ryzyko wystąpienia choroby, lecz akumulacja zmienionych alleli może mieć zasadnicze znaczenie dla jej rozwoju. W genomie człowieka jest około 3 mln polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), co stanowi około 90% wszystkich różnic w sekwencji. W pracy przedstawiono informacje na temat znaczenia jednonukleotydowych wariantów polimorficznych genów kodujących białka biorące udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA dla ryzyka raka piersi. W stosunkowo niewielkiej liczbie dostępnych prac przebadano niewielką liczbę SNP dla wybranych genów kodujących białka obu szlaków naprawy DNA zarówno HRR, jak i NHEJ. Statystycznie istotne zwiększenie ryzyka wystąpienia raka piersi zanotowano w przypadku osób, u których stwierdzono występowanie wariantów polimorficznych: *rs1801320*, *rs2412546*, *rs4417527*, *rs861539*, *rs144848* w genach kodujących białka RAD51, XRCC3 i BRCA2

*Praca finansowana z grantu nr N N301 289237 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wzrasta.

biorące udział w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną oraz w przypadku wariantów: *rs2267437*, *rs2075685* w genach *Ku70* oraz *XRCC4*, kodujących białka biorące udział w naprawie DNA na drodze niehomologicznego łączenia końców. Rak piersi jest chorobą poligeniczną, dlatego na szczególną uwagę zasługują badania SNP w wielu *loci* tych samych lub metabolicznie powiązanych genów. W przypadku genów kodujących białka naprawy DNA przez rekombinację homologiczną na szczególną uwagę zasługuje fakt, że te same warianty polimorficzne w różny sposób wpływają na ryzyko raka piersi u nosicieli określonych mutacji lub polimorfizmów w genach *BRCA1* lub *BRCA2* oraz u osób, u których takich mutacji lub polimorfizmów nie stwierdzono. Różnice te mogą odzwierciedlać odmienne znaczenie SNP dla powstawania i rozwoju sporadycznych i dziedzicznych raków piersi. Zaliczenie wariantu SNP do czynników ryzyka choroby nowotworowej nie jest możliwe jedynie na podstawie stwierdzenia występowania statystycznie istotnej różnicy w częstości polimorfizmu w grupie osób chorych i zdrowych. Z klinicznego punktu widzenia wariant polimorficzny może być uznany za rzeczywisty czynnik rozwoju choroby, jeżeli znany jest fizjologiczny mechanizm jego oddziaływania na organizm człowieka i jeżeli w sposób bezsporny można prześledzić jego wpływ na powstanie choroby. Na obecnym etapie, badania koncentrują się przede wszystkim na wytypowaniu wszystkich możliwych wariantów polimorficznych oraz ich kombinacji, potencjalnie mogących brać udział w rozwoju raka piersi. Duży postęp w tej dziedzinie zapewnią z pewnością mikroprocesory DNA, pozwalające w krótkim czasie określić genotyp w setkach miejsc polimorficznych.

Słowa kluczowe: polimorfizm genetyczny, dwuniciowe pęknięcia DNA, naprawa DNA, rak piersi.

Summary: Breast cancer is one of the most often female cancers. From the last few years in Poland morbidity increased about 4 – 5%. This cancer is also cause of the major part of deaths caused by malignant tumors. Etiology of most cases of breast cancer is not possible to determine. The most important risk factors are age and breast cancer occurrence in first and/or second step relatives. Germinal mutations in two major high penetrance genes, *BRCA1* and *BRCA2* are responsible for high risk of cancer development but they constitute less than 5% of all cases of this cancer. Breast cancer can be a result of genomic instability resulted from presence of DNA double strand breaks. DNA double strand breaks are one of the most dangerous DNA damage. Unrepaired can cause amplification or loss of genetic material, which in turn can cause neoplastic transformation by oncogene activation, inactivation of suppressor genes or loss of heterozygosity. Epithelial cells of mammary gland, in consideration of estrogen exposition are remarkable exposed to induction of different DNA damage, including also double strand breaks. These breaks are usually repaired with high fidelity by homologous recombination repair (HRR) or non-homologous end joining (NHEJ). Disorders of double strand DNA repair increase the breast cancer risk, in familiar as well as sporadic one. Differences in efficacy of DNA repair processes resulting from naturally occurred polymorphisms can also affect of breast cancer risk. Polymorphic genes of DNA repair are in great part included to low penetrance genes, with means that single gene product most often slightly affects the disease occurrence risk, but accumulation of changed alleles can have essential significance for it development. There are about 3 millions of single nucleotide polymorphisms (SNP) in human genome, which consist about 90% of all differences in the sequence. In the article were displayed information of significance of single nucleotide polymorphic variants of genes coding for proteins participating in DNA double strand breaks repair for breast cancer risk. In relatively small numbers of accessible articles, small number of SNPs for selected genes, coding for proteins of both DNA repair pathways, HRR as well as NHEJ were examined. The statistically important increase of the breast cancer occurrence risk was shown in case of persons, in which the occurrence of polymorphic variants was shown: *rs1801320*, *rs2412546*, *rs4417527*, *rs861539*, *rs144848* in genes coding for RAD51, XRCC3 and BRCA2 proteins, taking a part in homologous recombination and in case of variants: *rs2267437*, *rs2075685* in *Ku70* and *XRCC4* genes, coding for proteins taking a part in DNA repair by non homologous end joining. Breast cancer is the polygenic disease, therefore is particularly interesting to investigate of SNPs in multiple *loci* from the same or metabolically connected genes. In case of genes coding for proteins of the DNA repair by homologous recombination is particularly worthy to notice the fact, that the same polymorphic variants differentially affect breast cancer risk in carriers of specified mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes and in persons without such mutations and polymorphisms discovered. These differences can reflect different significance of SNP for occurrence and development of sporadic and hereditary breast cancers. The inclusion of SNP variant in disease risk factors is not possible only on the basis on occurring the statisti-

cally important difference in polymorphism frequency in groups of sick and healthy persons. From clinical point of view polymorphic variant can be accepted as the real disease development factor if we know physiological mechanism of its influence on the disease origin. At present stage, investigations focus first of all on the selection of all possible polymorphic variants and their combinations, potentially able to contribute in breast cancer development. The great progress in this area surely provide DNA microarrays, that allow in short time period genotype of hundreds polymorphic sites.

Key words: genetic polymorphism, DNA double-strand breaks, DNA repair, breast cancer.

Wykaz stosowanych skrótów: **ATM** (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) – białko zespołu chorobowego ataksja-telangiektazja; **BER** (ang. *base excision repair*) – naprawa DNA przez wycinanie zasad; **BRCA1** i **BRCA2** (ang. *breast cancer genes*) – geny dziedzicznej predyspozycji do raka piersi; **CHEK2** (ang. *cell cycle checkpoint kinase2*) – anty-onkogen, którego produkt białkowy jest kinazą biorącą udział w regulacji cyklu komórkowego; **DGGE** (ang. *denaturing gradient gel electrophoresis*) – elektroforeza w żelu z gradientem czynnika denaturującego; **DNA-PK_{CS}** (ang. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) – podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA; **DSB** (ang. *double-strand breaks*) – dwuniciowe pęknięcia DNA; **HRR** (ang. *homologous recombination repair*) – naprawa DNA przez rekombinację homologiczną; **MMR** (ang. *mismatch repair*) – naprawa błędnego sparowania zasad; **MRN** – kompleks białkowy MRE11/RAD51/NBS1; **MMS** (ang. *methyl methanesulfonate*) – metanosulfonian metylu; **NBS1** (ang. *Nijmegen breakage syndrome*) – białko związane z występowaniem zespołu chorobowego Nijmegen; **NER** (ang. *nucleotide excision repair*) – naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów; **NHEJ** (ang. *non homologous end-joining*) – naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców; **OR** (ang. *odds ratio*) – iloraz szans; **p53** (ang. *tumor protein 53*) – białko supresorowe o masie 53 kDa; **PIKK** (ang. *phosphoinositide 3-kinase related kinase*) – kinaza podobna do kinazy fosfatydylo-3-inozytolu; **PTEN** – białko supresorowe o aktywności fosfatazy; **PU** – przedział ufności; **RFLP** (ang. *restriction fragment length polymorphism*) – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; **SNP** (ang. *single-nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu; **SSCP** (ang. *single strand conformation polymorphism*) – polimorfizm zmiany konformacji jednoniciowego DNA; **SSR** (ang. *simple sequence repeats*) – powtórzenia prostych sekwencji; **STRP** (ang. *short tandem repeat polymorphism*) – polimorfizm powtarzającej się określonej sekwencji mikrosatelitarnej; **VNTR** (ang. *variable number of tandem repeats*) – polimorfizm powtarzającej się tandemowo określonej sekwencji minisatelitarnej; **XLF** (ang. *XRCC4-like factor/Cernunnos*) – białko procesu NHEJ, współdziałające z kompleksem XRCC4/ligaza IV; **XRCC2**, **XRCC3** i **XRCC4** (ang. *X-ray repair cross complementing group*) – białka grup komplementacyjnych naprawy uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem jonizującym.

1. WSTĘP

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet. W Polsce stanowi około 22% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe. Według Krajowego Rejestru Nowotworów Złośliwych w 2006 r. zarejestrowano 13 322 nowych zachorowań. W ciągu ostatnich kilku lat zachorowalność wzrosła o około 4 – 5%. Rak ten jest także przyczyną największej liczby zgonów wywołanych przez nowotwory złośliwe. Według najnowszych danych stanowi on przyczynę zgonu około 13% (5 212) wszystkich przypadków z rozpoznaniem nowotworów złośliwych [22, 24].

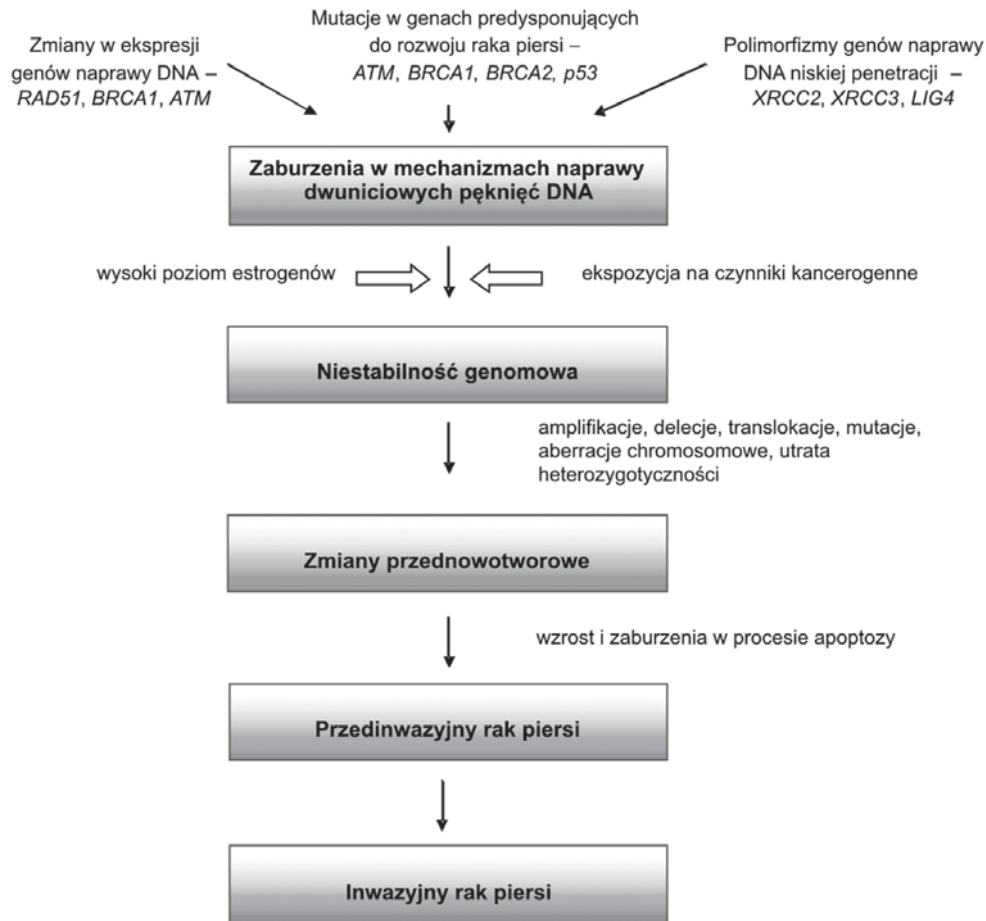
Etiologia większości przypadków raka piersi nie jest możliwa do ustalenia. Czynnikiem ryzyka o największym znaczeniu są wiek i występowanie raka piersi u krewnych I i/lub II stopnia. Mutacje germinalne w dwóch głównych genach wysokiej penetracji, **BRCA1** i **BRCA2**, odpowiedzialne są za wysokie ryzyko rozwoju raka piersi, jednakże stanowią one mniej niż 5% wszystkich przypadków tego nowotworu [8, 31].

Opublikowano szereg prac wskazujących na istotny związek raka piersi z zaburzeniami w mechanizmach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (DSB). Uważa się, że nieprawidłowości w naprawie DSB zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia zarówno sporadycznych, jak i rodzinnych raków piersi [17, 30, 36, 46]. Na związek ten wskazuje chociażby fakt, że produkty białkowe genów podatności na raka piersi – *BRCA1* i *BRCA2* czy *ATM* i *p53*, biorą udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA [14, 20, 36, 39, 48]. Naprawa DNA jest niezbędna dla utrzymania stabilności i integralności genomowej, a znaczące w niej zmiany mogą zasadniczo wpływać na genotyp i fenotyp komórki. Z jednej strony zmiany te mogą hamować wzrost komórek i prowadzić do ich śmierci, z drugiej natomiast mogą przyczyniać się do wzmożonej proliferacji i ostatecznie ekspansji komórek zmienionych nowotworowo. Zmiany w naprawie DNA mogą być modyfikowane przez efekty związane z obecnością różnych czynników, takich jak: estrogen czy rozmaite czynniki genotoksyczne, w tym kancerogeny (ryc. 1) [28]. Niewielkie zmiany w efektywności procesów naprawczych DNA, wynikające z naturalnie występujących polimorfizmów w genach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, również wpływają na ryzyko raka piersi. Polimorficzne geny naprawy DNA zaliczane są w większości do genów niskiej penetracji, co oznacza, że produkt pojedynczego genu z reguły nieznacznie wpływa na ryzyko wystąpienia choroby, lecz akumulacja zmienionych alleli może mieć zasadnicze znaczenie dla jej rozwoju. W pracy przedstawiono najczęściej badane warianty polimorficzne genów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA i ich znaczenie dla ryzyka raka piersi.

2. POLIMORFIZM GENETYCZNY

Polimorfizm genetyczny to zróżnicowanie genetyczne, które warunkuje zmienność wewnątrzgatunkową. Występuje on, gdy najrzadszy wariant alleliczny w danym *locus* pojawia się z częstością większą niż 1%. Polimorfizm może dotyczyć pojedynczego nukleotydu (SNP) lub też dłuższej, powtarzającej się wielokrotnie określonej sekwencji minisatelitarnej (VNTR) lub mikrosatelitarnej (STRP).

Polimorfizmy wszystkich typów są wykorzystywane jako fizyczne markery genetyczne. Szacuje się, że w genomie człowieka jest około 3 mln markerów SNP, co stanowi około 90% wszystkich różnic w sekwencji. Średnio SNP występuje co 1000 pz. Najczęściej spotykany jest polimorfizm dwualleliczny, rzadko trójalleliczny, natomiast prawdopodobieństwo wystąpienia czwartego allelu w danym *locus* jest bliskie zera. Większość SNP – 71% stanowią tranzycje, natomiast transwersje – 29%. W regionach kodujących najbardziej rozpowszechnione są synonimiczne SNP (49%). Jeżeli przyjąć, że statystyczny gen składa się z około 30 000 pz, to można spodziewać się około 150 SNP na gen w etnicznie zróżnicowanej populacji. Rozmieszczenie SNP w obrębie genu nie jest równomierne. Wyższa liczba zmiennych znajduje się w regionie 3'UTR, natomiast najniższa w regionach kodujących. W krótkich fragmentach DNA, SNP można identyfikować takimi technikami, jak np. SSCP, RFLP czy DGGE.



RYCINA 1. Etapy powstawania raka piersi [zmodyfikowano, 36]
 FIGURE 1. The multistep pathway of breast carcinogenesis [modified, 36]

Większość chorób człowieka jest poligeniczna, co wynika z zależnego działania dwóch lub najczęściej wielu, kilkudziesięciu lub kilkuset, genów, oraz wieloczynnikowa, tzn. wywołana przez skorelowane działanie wielu różnych czynników. Grupa związanych SNP, które nie ulegają segregacji w sposób przypadkowy, nazywana jest haplotypem. Określa on rodzaj zależności występującej między wariantami sekwencyjnymi w tym samym chromosomie. Wyliczona teoretycznie liczba haplotypów to 2150, natomiast ich rzeczywista liczba wynosi 15 – 100 różnych haplotypów na jeden gen. Większość zbadanych haplotypów, około 77%, wykryto u przedstawicieli wszystkich grup etnicznych, natomiast pozostałe 13% było specyficzne populacyjnie [25].

W genomie człowieka zidentyfikowano, co najmniej dwie grupy genów, których polimorfizm genetyczny może mieć wpływ na podatność na różne choroby, w tym

również choroby nowotworowe. Pierwsza to ogromna grupa genów (10% wszystkich genów) kodujących elementy systemów zajmujących się usuwaniem substancji genotoksycznych z komórki. Produkty tych genów biorą udział w procesach przekształcania (enzymy I fazy) nierozpuszczalnych w wodzie substancji na rozpuszczalne, które mogą być usunięte z komórki (enzymy II fazy). Druga grupa, choć znacznie mniejsza – około 150 genów w genomie człowieka [53], to geny kodujące białka procesów naprawy DNA. Ta grupa genów zwana jest genami stabilizacyjnymi lub mutatorowymi. W toku ewolucji wykształciły się rozmaite mechanizmy naprawy DNA, takie jak: naprawa przez wycinanie zasad azotowych (BER) [42] i nukleotydów (NER) [41], naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR) [33] oraz naprawa przez rekombinację homologiczną (HRR) [34] i niehomologiczne łączenie końców DNA (NHEJ) [35, 52]. Białka naprawy DNA funkcjonują w niezwykle skomplikowanej sieci wzajemnych zależności i interakcji z innymi białkami, z których do najważniejszych należą białka kontrolujące cykl komórkowy i apoptozę. Badania epidemiologiczne wskazują, że dziedziczenie polimorficznych genów w jednym lub kilku *loci* powoduje zmiany w procesach naprawy uszkodzeń DNA, co w konsekwencji może powodować nieodwracalne zmiany w genomie, inicjujące kancerogenezę.

Strategia badań populacyjnych SNP polega na porównaniu częstości występowania określonych wariantów polimorficznych w grupie osób chorych i zdrowych. Przyjmuje się, że dany polimorfizm może być związany z wystąpieniem choroby, w naszym przypadku raka piersi, jeżeli jego częstość jest w sposób statystycznie istotny wyższa u osób chorych niż u zdrowych. Najczęściej stosowanymi narzędziami badawczymi są regresja logistyczna oraz testy oparte na modelu χ^2 . Jednym z parametrów regresji logistycznej powszechnie używanym w badaniach tego typu jest iloraz szans (OR). Wskazuje on ile razy prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia (szansy) jest większe w jednej z badanych grup od prawdopodobieństwa wystąpienia tego zdarzenia w drugiej grupie [49]. Wartość ilorazu szans równa w przybliżeniu 1 oznacza równość szans na wystąpienie zdarzenia w obu grupach, wartości wyższe od 1 ($1, +\infty$) oraz niższe od 1 $[0, 1)$ oznaczają odpowiednio większą i mniejszą szansę wystąpienia zdarzenia w jednej grupie niż w drugiej. W przypadku SNP iloraz szans oznacza więc, ile razy częściej (lub rzadziej) określony wariant polimorficzny występuje w grupie osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Stąd na pierwszy rzut oka logicznym wydaje się zaliczenie wariantu SNP do czynników ryzyka choroby nowotworowej. Jednak należy pamiętać, że wykazanie zależności statystycznej nie jest równoważne z rzeczywistym jej istnieniem. Zależność ta może być przypadkowa, może wynikać z błędów w postępowaniu eksperymentalnym lub rzeczywisty czynnik ryzyka może być zupełnie inny, a wykazana zależność statystyczna wynika jedynie z występowania badanego SNP w tym samym haplocyocie. Najczęściej popełnianym błędem eksperymentalnym jest zbadanie zbyt małej liczby przypadków, czego konsekwencją jest stosunkowo niska moc statystyczna otrzymanych wyników. Rozwiązaniem tego problemu jest meta-analiza, jednak warunkiem koniecznym jej przeprowadzenia są porównywalne kryteria doboru przypadków w badanych populacjach. W chwili obecnej niewiele prac spełnia ten warunek. Osobny, poważny problem stanowią stosunkowo duże kłopoty z

opublikowaniem wyników negatywnych, szczególnie jeżeli badania zostały przeprowadzone na niewielkiej liczbie przypadków.

3. USZKODZENIA I NAPRAWA DNA W RAKU PIERSI

Dwuniciowe pęknięcia DNA należą do najgroźniejszych uszkodzeń DNA. Czynniki endogennymi, które je indukują, są m.in. wolnorodnikowe produkty metabolizmu komórki i zatrzymane widełki replikacyjne. Pęknięcia te powstają także jako efekt zahamowania aktywności topoizomeraz klasy II oraz procesów naprawy DNA. Najnowsze badania pokazują, że dwuniciowe pęknięcia mogą również powstawać spontanicznie w obrębie przestrzennych struktur DNA, odmiennych od kanonicznej struktury B-DNA opisanej przez Watsona i Cricka. Struktury te to: tripleksy, tetrapleksy, struktury krzyżowe, struktury szpilki do włosów czy Z-DNA, powstające w rejonach sekwencji mikrosatelitarnych SSR. W ich obrębie obserwuje się wysoką częstość pęknięć DNA, a w efekcie ich naprawy może dochodzić do różnorodnych mutacji, w tym dużych delecji, inwersji, duplikacji i translokacji. Tego typu mutacje opisuje się w przypadkach wielu chorób genetycznych, w tym chorób nowotworowych [3, 51].

Do czynników pochodzenia zewnętrznego indukujących dwuniciowe pęknięcia DNA zalicza się przede wszystkim promieniowanie jonizujące oraz niektóre związki chemiczne, takie jak np. bleomycynę i jej pochodne czy metanosulfonian metylu (MMS). Nienaprawione dwuniciowe pęknięcia DNA mogą powodować amplifikację lub utratę materiału genetycznego, co z kolei może prowadzić do transformacji nowotworowej przez aktywację onkogenów, inaktywację genów supresorowych lub utratę heterozygotyczności [46].

Badania wskazują, że komórki nabłonkowe gruczołu piersiowego, ze względu na ekspozycję na estrogen, są szczególnie narażone na indukcję różnych uszkodzeń DNA, w tym także pęknięć dwuniciowych [5, 36, 37]. Metabolity estrogenów powodują uszkodzenia oksydacyjne DNA, duże addukty i pęknięcia nici DNA. Stymulowana hormonalnie proliferacja w nabłonku piersi może prowadzić do zablokowania widełek replikacyjnych i w konsekwencji do dwuniciowych pęknięć DNA. Estrogen zatem odgrywa podwójną rolę – jako hormon stymulujący wzrost komórek oraz jako czynnik indukujący uszkodzenia DNA.

Komórki nabłonkowe, limfocyty i fibroblasty, pochodzące od pacjentek z rakiem piersi wykazują zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące w porównaniu z komórkami kobiet zdrowych [36]. Co więcej, badania nad efektywnością naprawy DNA wykazały, że osoby, u których usuwanie uszkodzeń DNA było mniej wydajne niż przeciętne w danej populacji, częściej znajdowały się w grupie chorych na raka niż w grupie osób zdrowych. Obniżona zdolność naprawy DNA jest zatem uznawana za czynnik ryzyka, predysponujący do rozwoju różnych typów nowotworów [46].

Rak piersi może być wynikiem niestabilności genomowej wynikającej z obecności dwuniciowych pęknięć DNA. Należy podkreślić, że niestabilność genomowa, u

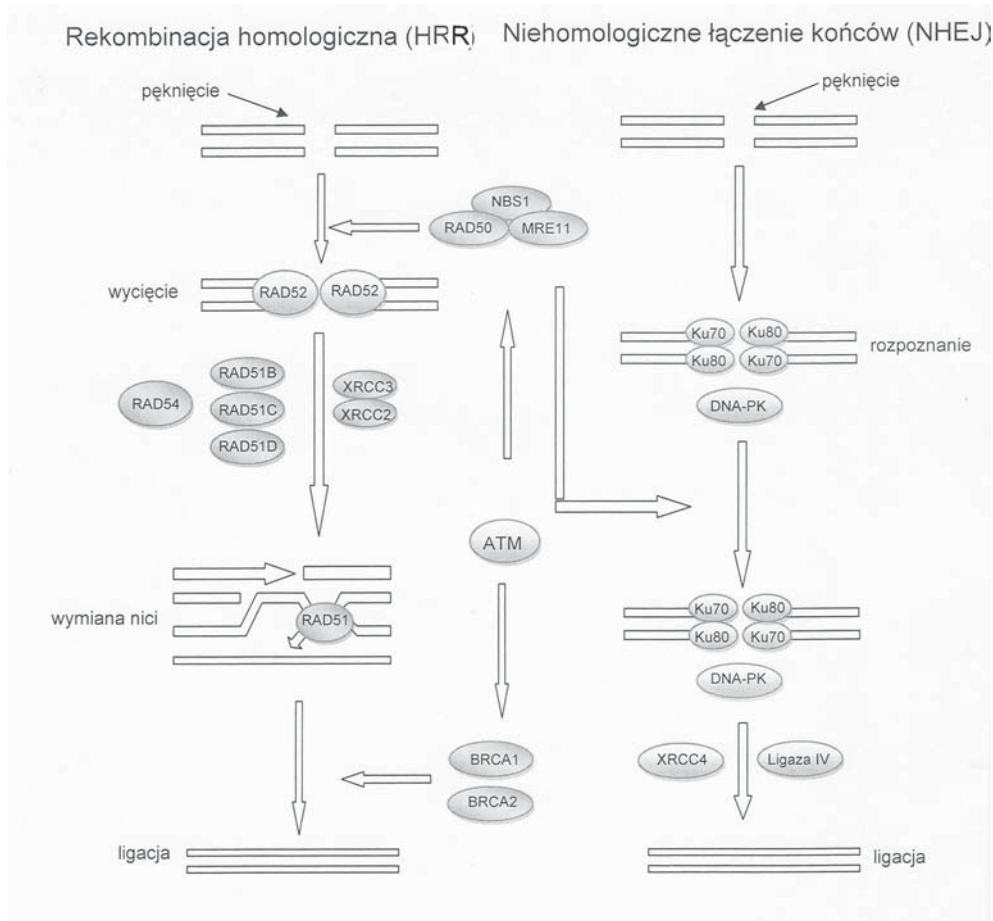
podstaw której leżą pęknięcia dwuniciowe DNA, nie jest zjawiskiem powszechnym. Badania przeprowadzone na pacjentach z rakiem prostaty wykazały, że nie są oni bardziej wrażliwi na promieniowanie jonizujące w przeciwieństwie do pacjentów z rakiem piersi [36, 47]. Aberracje w genach podatności na raka piersi – *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* i *p53* inicjują tworzenie się guzów nie tylko w syndromie rodzinnym, ale także w sporadycznym raku piersi i przyczyniają się do różnorodności genetycznej guza. W normalnych komórkach człowieka uszkodzenia pojedynczej nici są przekształcane do 50 pęknięć dwuniciowych na cykl komórkowy. Pęknięcia te są zwykle naprawiane z wysoką dokładnością, ale błędy w naprawie przyczyniają się znacząco do rozwoju raka [36]. Zaburzenia w naprawie DNA są kluczowym etapem w tworzeniu fenotypu z mutacjami. Fenotyp ten może być wynikiem zarówno zmniejszenia dokładności naprawy DNA przez rekombinację homologiczną albo może być efektem przeniesienia naprawy na mniej dokładny proces naprawy DNA przez niehomologiczne łączenie końców.

Do wzrostu guza potrzebne są dodatkowe mutacje albo zmiany epigenetyczne. Nieprawidłowy nadzór sprawowany nad naprawą DNA przyspiesza wieloetapowy proces nowotworzenia przez inaktywację genów, które regulują wzrost albo promują śmierć komórki, tym samym przyczyniając się do zapoczątkowania raka. Tak, więc kobiety, ze zredukowaną zdolnością naprawy dwuniciowych pęknięć DNA mają zwiększone ryzyko wystąpienia raka piersi. Badania wskazują, że 1% spadek zdolności naprawy DNA powoduje 22% wzrost ryzyka raka piersi [36].

Z drugiej strony jest całkiem możliwe, że niestabilność genomowa wynikająca z zaburzonej naprawy dwuniciowych pęknięć DNA jest raczej efektem nadekspresji genów i w ogólności nadaktywności naprawy DNA niż jej redukcji. Taką możliwość sugerują badania, w których obserwowano zwiększony poziom białka RAD51 i jego analogów w komórkach nowotworowych [44]. Nadekspresja genów naprawy DNA, w szczególności naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz zatrzymanych widełek replikacyjnych, związana jest z powstawaniem przerzutów nowotworowych [38] oraz chemio- i radiooporności [21].

4. POLIMORFIZMY GENÓW NAPRAWY DNA PRZEZ REKOMBINACJĘ HOMOLOGICZNĄ

Głównym białkiem biorącym udział w przekazywaniu sygnałów w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA jest kinaza ATM, należąca do rodziny kinaz serynowo-treoninowych podobnych do kinaz fosfatydylo-3-inozytolu (PIKK) (ryc. 2). Kinaza ta aktywuje białka kompleksu MRN złożonego z białek: MRE11, RAD50 i NBS1. Konsekwencją tego jest aktywacja punktów kontrolnych fazy S i G2/M oraz zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawa DNA. Aktywność kompleksu MRN jest regulowana przez białko BRCA1. W następstwie dwuniciowych pęknięć białko to wiąże się z DNA i hamuje egzonukleolityczną aktywność kompleksu [48].



RYCINA 2. Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA przez rekombinację homologiczną (HRR) i niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) [zmodyfikowano, 15]

FIGURE 2. DNA double strand breaks repair pathways by homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ) [modified, 15]

Podstawowym białkiem naprawy DNA przez rekombinację homologiczną jest białko RAD51, będące homologiem białka RecA *E. coli*. RAD51 formuje, wraz z jednoniciowym DNA, nukleofilamenty i dokonuje inwazji na homologiczny fragment DNA. Zanim to jednak nastąpi, kompleks MRN przycina końce DNA odsłaniając zakończenia 3'. Końce DNA są zabezpieczane przed atakiem nukleaz przez połączenie z białkami RPA i RAD52. Warunkiem niezbędnym do wytworzenia trójniciowego kompleksu synaptycznego jest zastąpienie białka RPA przez RAD51. Etap ten odbywa się przy udziale kompleksu białkowego złożonego z: RAD51B (RAD51L1), RAD51C (RAD51L2), RAD51D (RAD51L3), XRCC2 i XRCC3 [44]. Dzięki niemu następuje przełamanie bariery energetycznej związanej z wyższym powinowactwem RPA, w porównaniu z RAD51, do jednoniciowego DNA [34].

Aktywność enzymatyczna, jak i transport RAD51 do jądra komórkowego regulowane są przez białko BRCA2 [48].

Gen *RAD51*

Najczęściej badanym polimorfizmem SNP genu *RAD51* jest polimorfizm c.-98 G>C w pozycji 135 w rejonie nieulegającym translacji (5'UTR) (*rs 1801320*). Wykazano, że polimorfizm ten zwiększa ryzyko raka piersi u nosicielek mutacji w genie *BRCA2* [2, 6]. W pracy [2] przedstawiono zestawienie 19 badań tego polimorfizmu na grupie 8 512 nosicielek mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*. Analiza ryzyka raka piersi pokazała jego wzrost jedynie w przypadku homozygot CC wśród nosicielek mutacji w genie *BRCA2*. Badania przeprowadzone na polskiej populacji wykazały natomiast, że allel C zmniejsza niemal dwukrotnie ryzyko raka piersi w porównaniu do allelu G, ale u nosicielek mutacji w genie *BRCA1* [19]. Zatem polimorfizm ten można uznać za czynnik wpływający na ryzyko raka piersi występującego rodzinnie. Natomiast w przypadku sporadycznego raka piersi nie obserwuje się takiej zależności [6, 23, 43, 50].

Lokalizacja polimorfizmu c.-98 G>C w rejonie 5'UTR wskazuje, że może on mieć związek ze stabilnością mRNA i procesem translacji, wpływając tym samym na poziom białka. Badania wykazały, że transkrypt genu *RAD51* występuje w postaci głównie dwóch izoform [2]. Izoforma I jest dłuższa, ma 257 pz, natomiast izoforma II powstająca w wyniku alternatywnego składowania jest krótsza, ma 153 pz. Wykazano także, że fragment o długości 104 pz, którego brak jest w izoformie II transkryptu *RAD51*, zawiera dużo par GC (77%). Taka sekwencja sprzyja powstawaniu przestrzennych struktur działających jak negatywne regulatory translacji [18, 55]. Można zatem przypuszczać, że izoforma II ma większy potencjał translacyjny. Ponieważ poziom tej izoformy jest niższy w liniach komórkowych o genotypie CC, to można przypuszczać, że genotyp ten wiąże się z mniejszą ilością białka RAD51 i tym samym większym ryzykiem raka piersi.

Przebadano także inne warianty polimorficzne tego genu: 19 154A>G (*rs2412546*), 20 944A>G (*rs11858338*), 25 326>C (*rs2412547*), 32 498A>G (*rs11633269*), 33 911G>C (*rs4417527*) na grupie 933 kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi i grupie 1539 kobiet zdrowych, stanowiących kontrolę [9]. Wykazano, że dwa warianty polimorficzne genu *RAD51* mają bezpośredni związek z ryzykiem raka piersi, obecność genotypu G/G polimorfizmu 19154A>G oraz C/C polimorfizmu 33 911G>C zwiększała ryzyko wystąpienia raka piersi (OR = 1,39; 95% PU 1,02 – 1,25) oraz (OR = 1,40; 95% PU 1,08 – 1,80).

Badano także polimorfizm Glu233Gly (c.698 A>G, egzon 8) (*rs 28363284*) innego genu z rodziny *RAD51* – *RAD51D*. Zaobserwowano, że polimorfizm ten nie wpływa na ryzyko raka piersi ani u kobiet z historią rodzinną (OR = 1,30; 95% PU 0,66 – 2,58), ani u kobiet bez historii choroby (OR = 1,28; 95% PU 0,47 – 3,43) [10]. Wyniki innych badań pokazały, że wariant ten zwiększa wzrost i oporność komórek raka piersi na cisplatynę w sposób zależny od białka p53 [29].

Gen *XRCC2*

Tranzycja G>A (c.563 G>A, egzon 3) w pozycji 31 479 powodująca zmianę argininy na histydynę w pozycji 188 (*rs 3218536*) jest polimorfizmem genu *XRCC2* często badanym w kontekście ryzyka raka piersi. Jednakże wyniki badań tego polimorfizmu są sprzeczne [13, 44, 50]. Najnowsze badania przeprowadzone na dużych grupach kobiet wykazały ochronny wpływ allelu kodującego His na ryzyko raka piersi (OR = 0,89; 95% PU 0,80 – 0,99; zbadano 4 470 kobiet z rakiem piersi i 4 560 kobiet zdrowych) [32], (OR = 0,79; 95% PU 0,62 – 1,00; zbadano 1 109 kobiet z rakiem piersi i 1 177 kobiet zdrowych [27]).

Gen *XRCC3*

Gen *XRCC3* zlokalizowany jest w chromosomie 14 (14q32.3). Występujący z częstością 0,23 – 0,38 polimorfizm Thr214Met (*rs 861539*) spowodowany jest tranzycją C>T w pozycji 1806 (c.722 C>T, egzon 8). Badania dowodzą, że allel kodujący Met związany jest z wyższym poziomem adduktów DNA, nieprawidłowościami w przebiegu mitozy oraz mniejszą efektywnością naprawy uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem X, zwiększoną częstością aberracji chromosomowych oraz wrażliwością na związki tworzące wiązania krzyżowe [4]. Jednakże wyniki badań dotyczących tego polimorfizmu w raku piersi nie są jednoznaczne [6, 13, 45, 50]. Wykazano [23], że obecność genotypu Thr/Met zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych (OR = 2,56; 95% PU 1,27 – 5,17). Meta-analiza opublikowanych danych wskazuje natomiast na niewielki wzrost ryzyka raka piersi wśród kobiet homozygot Met (OR = 1,18; 95% PU 1,04 – 1,34) [13] i (OR = 1,072; 95% PU 1,014 – 1,133) [11].

W genie tym analizowano jeszcze dwa inne miejsca polimorficzne, tj. Ex2 + 2A>G (c.-316 A>G, 5'UTR) (*rs 1799794*) oraz IVS7-14A>G (c.562-14A>G, intron 7) (*rs 1799796*). Nie wykazano związku między wariantem Ex2 + 2A>G (5' UTR) a ryzykiem raka piersi [13]. Badania przeprowadzone na populacji polskiej i amerykańskiej wykazały zmniejszenie ryzyka raka piersi dla rzadszych homozygot polimorfizmu IVS7-14A>G. Badania przeprowadzone na populacji amerykańskiej nie potwierdziły jednak tej zależności [13].

Analiza haplotypów pokazała, że kobiety o haplocie AGC, występującym z częstością 31% wśród pacjentek i 34% wśród kobiet zdrowych, mają mniejsze ryzyko zachorowania na raka piersi niż kobiety o najczęstszym haplocie AAT (38% pacjentek i 36% kobiet zdrowych). Analiza ta wykazała także, że rzadki haplotyp GAT występujący częściej u pacjentek (0,12%) w porównaniu z kobietami zdrowymi (0,06%) może być związany z większym ryzykiem raka piersi [13].

Gen *BRCA2*

Gen *BRCA2* zlokalizowany jest w chromosomie 13 (13q12-13). Polimorfizm w pozycji -26 będący zamianą G w A (c.-26G>A, 5'UTR) (*rs 1799943*) zmniejsza ryzyko raka piersi (GA vs AA OR = 0,6; 95% PU 0,5 – 0,8) [14]. Natomiast

polimorfizm Asn372His (c.1114A>C, egzon 10) (*rs 144848*) według tych samych badań jest związany ze wzrostem ryzyka zachorowania (His/His vs Asn/Asn OR = 1,3; 95% PU 1,0 – 1,6). Zależność ta została potwierdzona w obszernej analizie przeprowadzonej w Australii – 1397 osób z rakiem piersi i 775 osób zdrowych (His/His vs Asn/Asn/Asn/His OR = 1,4; 95% PU 1,0 – 2,0) [15]. Dwa badania wykonane w USA nie dowiodły zależności między tym polimorfizmem a rakiem piersi [7, 13]. Słaby związek wykazano natomiast dla populacji polskiej [13]. Meta-analiza danych uzyskanych dla populacji amerykańskiej i polskiej (13 032 osób chorych i 13 314 osób zdrowych) pokazała niewielki wzrost ryzyka choroby dla homozygot His (OR = 1,13; 95% PU 1,01 – 1,28) [13]. Podobnie, meta-analiza tego polimorfizmu przeprowadzona przez *The Breast Cancer Association Consortium* na podstawie wyników 18 badań populacyjnych, pokazała niewielki wzrost ryzyka raka piersi dla homozygot His na poziomie 1,12, a dla heterozygot na poziomie 1,05 [45].

Zbadano również dwa inne warianty polimorficzne genu *BRCA2* – Thr1915Met (c.5744C>T) (*rs 4987117*) i Met784Val (c.2350A>G) (*rs 11571653*) [43]. Udowodniono, że obie homozygoty pierwszego wariantu zwiększają ryzyko raka piersi (Met/Met, OR = 3,25; PU 1,76 – 6,01 i Thr/Thr, OR = 4,43; PU 2,32 – 8,49), natomiast heterozygota zmniejsza to ryzyko (OR = 0,17; PU 0,10 – 0,28). W tej samej pracy pokazano także, że genotyp Met/Met-G/G wynikający z wariantów polimorficznych Met1915Thr i 135 G>C, genów odpowiednio *BRCA2* i *RAD51*, jeszcze bardziej zwiększa to ryzyko (OR = 5,75; 95% PU 2,31 – 14,31). Polimorfizm Met784Val nie ma wpływu na ryzyko raka piersi. Wykazano, że polimorfizm Thr1915Met zmniejsza ryzyko raka piersi (OR = 0,62; 95% PU 0,49 – 0,79), natomiast u nosicieli mutacji w genie *CHEK2* zwiększa ryzyko wystąpienia tego nowotworu (OR = 5,70; 95% PU 1,7 – 19,00) [40].

Badania przeprowadzone na synonimicznych wariantach polimorficznych *BRCA2* – Ser455Ser (c.1365A>G) (*rs 1801439*) i Ser2414Ser (c.7242A>G) (*rs 1799955*) udowodniły, że nie mają one związku z ryzykiem raka piersi występującego rodzinnie [54].

5. POLIMORFIZMY GENÓW NAPRAWY DNA PRZEZ NIEHOMOLOGICZNE ŁĄCZENIE KOŃCÓW

W procesie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ), zakończenia uszkodzonych fragmentów DNA są zbliżane do siebie, modyfikowane w celu umożliwienia ich połączenia i następnie łączone (ryc. 2). Pierwszym etapem NHEJ jest związanie białek Ku (Ku70 i Ku80) z końcami DNA i zabezpieczenie DNA przed degradacją przez egzonukleazy. Następnie do białek Ku dołącza się podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK_{CS}), która pełni rolę „molekularnego mostu” zbliżającego do siebie oba końce uszkodzonego DNA. Ostatnim etapem NHEJ jest ligacja końców DNA przeprowadzana przez kompleks białek XRCC4/ligaza DNA IV przy udziale białka *Cernunnos*, zwanego także XLF. Proces ligacji poprzedzony jest przekształceniem nieligowalnych końców

w końcu mogące podlegać łączeniu. Kluczową rolę w przekształcaniu końców odgrywa białko Artemis tworzące kompleks z DNA-PK_{CS} [35, 52].

Przedstawiono [12] analizę 30 wariantów polimorficznych SNP w 5 genach kodujących białka procesu NHEJ, tj. *Ku70*, *Ku80*, *DNA-PK_{CS}*, *ligazę DNA IV* i *XRCC4*. Badania przeprowadzono na grupie 254 pacjentek z rakiem piersi oraz 379 osobach zdrowych. Tylko w przypadku dwóch wariantów, tj. C-61G (c.88+57G>C) (*rs 2267437*) w genie *Ku70* oraz T1394G (c.3+475C>A) (*rs 2075685*) w genie *XRCC4* wykazano związek ze wzrostem ryzyka raka piersi. Badania te pokazały ponadto tendencję w kierunku wzrostu ryzyka u kobiet, które mają więcej zmiennych alleli genów naprawy NHEJ (OR = 1,46; PU 1,19 – 1,80). Związek ten był silniejszy u kobiet narażonych na działanie estrogeny, a więc m.in. takich, które nie były w ciąży.

Badano [1] 4 warianty polimorficzne genu *XRCC4* (*rs1478485*, *rs13180316*, *rs963248*, *rs1056503*) oraz ich związek z występowaniem raka piersi i wiekiem zdiagnozowania tego nowotworu. Badania przeprowadzono na grupie 464 kobiet z rakiem piersi (bez mutacji w genach *BRCA1/2*) i 576 osobowej grupie kontrolnej. Udowodniono, że obecność haplotypu GG (*rs1478485* i *rs13180316*) ma efekt ochronny, podczas gdy haplotyp GA zwiększa ryzyko raka piersi. Zaobserwowano także, że haplotyp AGTG ma związek ze zdiagnozowaniem raka piersi w późnym wieku (średnia wieku $67,17 \pm 10,94$), natomiast u nosicielek haplotypu GATT zdiagnozowanie nowotworu ma miejsce wcześniej (średnia wieku $54,04 \pm 11,58$) [1].

Analiza porównawcza różnych wariantów polimorficznych genów naprawy DNA i ich wpływu na ryzyko raka piersi wskazuje, że to właśnie polimorfizm genów NHEJ może odgrywać zasadniczą rolę w kształtowaniu tego ryzyka [16].

Polimorfizm c.1704T>C (Asp568Asp) (*rs 1805386*) w genie *LIG4* zmniejsza ryzyko raka piersi (CC vs TT OR = 0,7; PU 0,4 – 1,0) [13]. Badania przeprowadzone na populacji koreańskiej [25] i meta-analiza wariantów polimorficznych tego genu przeprowadzona dla populacji polskiej i amerykańskiej nie potwierdziły jednak tego wyniku [13].

PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiono przegląd dostępnych badań populacyjnych dotyczących związku polimorfizmów SNP w genach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA z ryzykiem raka piersi. Z klinicznego punktu widzenia wariant polimorficzny może być uznany za rzeczywisty czynnik rozwoju choroby, jeżeli znany jest fizjologiczny mechanizm jego oddziaływania na organizm człowieka i jeżeli w sposób bezsporny można prześledzić jego wpływ na powstanie choroby. Na obecnym etapie, badania koncentrują się przede wszystkim na wytypowaniu wszystkich możliwych wariantów polimorficznych oraz ich kombinacji, potencjalnie mogących brać udział w rozwoju raka piersi. Ogromny postęp w określaniu ryzyka raka na podstawie zmienności genetycznej na pewno przyniosą badania z użyciem mikroprocesorów DNA, umożliwiających analizę setek genów w niezwykle krótkim czasie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLEN-BRADY K, CANNON-ALBRIGHT LA, NEUHAUSEN SL, CAMP NJ. A role for *XRCC4* in age at diagnosis and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 1306–1310.
- [2] ANTONIOU AC, SINILNIKOVA OL, SIMARD J i wsp. *RAD51* 135G→C modifies breast cancer risk among *BRCA2* mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 1186–1200.
- [3] BACCOLLA A, WELLS RD. Non-B DNA conformations as determinants of mutagenesis and human disease. *Mol Carcinog* 2009; **48**: 273–285.
- [4] BROOKS J, SHORE RE, ZELENIUCH-JACQUOTTE A, CURRIE D, AFANASYEVA Y, KOENIG KL, ARSLAN AA, TONIOLO P, WIRGIN I. Polymorphisms in *RAD51*, *XRCC2*, and *XRCC3* are not related to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2008; **17**: 1016–1019.
- [5] CHENG TC, CHEN ST, HUANG CS, FU YP, YU JC, CHENG, CW, WU PE, SHEN CY. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the catechol estrogen-metabolizing genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2005; **113**: 345–353.
- [6] COSTAS, PINTO D, PEREIRA D, RODRIGUES H, CAMESELLE-TEJEIRO J, MEDEIROS R, SCHMITT F. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. *Breast Cancer Res Treat* 2007; **103**: 209–217.
- [7] COX DG, HANKINSON SE, HUNTER DJ. No association between *BRCA2* N372H and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**: 1353–1354.
- [8] DAPIC V, CARVALHO MA, MONTEIRO AN. Breast cancer susceptibility and the DNA damage response. *Cancer Control* 2005; **2**: 127–136.
- [9] DING S-L, YU J-C, CHEN S-T, HSU G-C, KUO S-J, LIN YH, WU P-E, SHEN C-Y. Genetic variants of *BLM* interact with *RAD51* to increase breast cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2009; **30**: 43–49.
- [10] DOWTY JG, LOSE F, JENKINS MA, CHANG J-H, CHEN XQ, BEESLEY J, DITE GS, SOUTHEY MC, BYRNES GB, TESORIERO A, GILES GG, HOPPER JL, SPURDLE AB. The *RAD51* DE233G variant and breast cancer risk: population-based and clinic-based family studies of Australian women. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **112**: 35–39.
- [11] ECONOMOPOULOS KP, SERGENTANIS TN. *XRCC3* Thr241Met polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2009; w druku.
- [12] FU Y-P, YU J-C, CHENG T-C, LOU MA, HSU GC, WU CY, CHEN S-T, WU H-S, WU P-E, SHEN C-Y. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res* 2003; **63**: 2440–2446.
- [13] GARCIA-CLOSAS M, EGAN KM, NEWCOMB PA i wsp. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland and meta-analyses. *Hum Genet* 2006; **119**: 376–388.
- [14] GATZ SA, WIESMÜLLER L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1003–1016.
- [15] GOOD EL, ULRICH CM, POTTER JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; **11**: 1513–1530.
- [16] HAN J, HAIMAN C, NIU T, GUO Q, COX DG, WILLETT WC, HANKINSON SE, HUNTER DJ. Genetic variation in DNA repair pathway genes and premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2009; **115**: 613–622.
- [17] HSU HM, WANG HC, CHEN ST, HSU GC, SHEN CY, YU JC. Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**: 2024–2032.
- [18] HUGHES TA. Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet* 2006; **22**: 119–122.
- [19] JAKUBOWSKA A, GRONWALD J, MENKISZAK J, GÓRSKI B, HUZARSKI T, BYRSKI T, EDLER L, LUBIŃSKI J, SCOTT RJ, HAMANN U. The *RAD51* 135 G>C polymorphism modifies breast cancer and ovarian cancer risk in Polish *BRCA1* mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**: 270–275.
- [20] JASIN M. Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the *BRCA* connection. *Oncogene* 2002; **21**: 8981–8993.
- [21] KLEIN HL. The consequence of *Rad51* overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair* 2008; **7**: 686–693.

- [22] KRAJOWY REJESTR NOWOTWORÓW. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii w Warszawie; <http://epid.coi.waw.pl/krn/>.
- [23] KRUPA R, SYNOWIEC E, PAWLOWSKA E, MORAWIEC Z, SOBCZUK A, ZADROŻNY M, WOZNIAK K, BŁASIAK J. Polymorphism of the homologous recombination repair genes *RAD51* and *XRCC3* in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2009; **87**: 32–35.
- [24] KRZAKOWSKI M. Rak piersi – charakterystyka problemu zdrowotnego w Polsce. *MediWeb* 2007.
- [25] LADIGES W, KEMP C, PACKENHAM J, VELAZQUEZ J. Human gene variation: from SNPs to phenotypes. *Mutat Res* 2004; **545**: 131–139.
- [26] LEE K-M, CHOI J-Y, KANG C, KANG CP, PARK SK, CHO H, CHO D-Y, YOO K-Y, NOH D-Y, AHN S-H, PARK C-G, WEI Q, KANG D. Genetic polymorphisms of selected DNA repair genes, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 2005; **15**: 4620–4626.
- [27] LOIZIDOU MA, MICHAEL T, NEUHAUSEN SL, NEWBOLD RF, MARCOU Y, KAKOURI E, DANIEL M, PAPADOPOULOS P, MALAS S, KYRIACOU K, HADJISAVVAS A. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC2* and *XRCC3* and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **112**: 575–579.
- [28] MILLIKAN RC, PLAYER JS, DECOTRET AR, TSE C-K, KEKU T. Polymorphisms in DNA repair genes, medical exposure to ionizing radiation and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**: 2326–2334.
- [29] NADKARNI A, RAJESH P, RUCH RJ, PITTMAN DL. Cisplatin resistance conferred by the *RAD51D* (E233G) genetic variant is dependent upon p53 status in human breast carcinoma cell lines. *Mol Carcinogenesis* 2009; **48**: 586–591.
- [30] O'DRISCOLL M, JEGGO PA. The role of double-strand break repair – insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 2006; **7**: 45–54.
- [31] OLDENBURG RA, MEIJERS-HEIJBOER H, CORNELISSE CJ, DEVILEE P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; **63**: 125–149.
- [32] POOLEY KA, BAYNES C, DRIVER KE, TYRER J, AZZATO EM, PHAROACH PD, EASTON DF, PONDER BA, DUNNING AM. Common single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; **12**: 3482–3489.
- [33] POPLAWSKI T, BŁASIAK J. Naprawa błędnie sparowanych zasad. *Post Bioch* 2003; **49**: 126–135.
- [34] POPLAWSKI T, BŁASIAK J. Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków. *Post Bioch* 2005; **52**: 180–193.
- [35] POPLAWSKI T, STOCZYŃSKA E, BŁASIAK J. Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców – nowe białka, nowe funkcje, nowe mechanizmy. *Post Bioch* 2009; **55**: 36–45.
- [36] RALHAN R, KAUR J, KREIENBERG R, WIESMÜLLER L. Links between DNA double-strand break repair and breast cancer: Accumulating evidence from both familial and non-familial cases. *Cancer Lett* 2007; **248**: 1–17.
- [37] ROY D, LIEHR JG. Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat Res* 1999; **424**: 107–115.
- [38] SARASINA A, KAUFFMANN A. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: A new hypothesis. *Mutat Res* 2008; **659**: 49–55.
- [39] SEHL ME, LANGER LR, PAPP JC, KWAN L, SELDON JL, ARELLANO G, REISS J, REED EF, DANDEKAR S, KORIN Y, SINSHEIMER JS, ZHANG Z-F, GANZ PA. Associations between single nucleotide polymorphisms in double-stranded DNA repair pathway genes and familial breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 2192–2203.
- [40] SERRANO-FERNÁNDEZ P, DĘBNIAK T, GÓRSKI B, BOGDANOVA N, DÖRK T, CYBULSKI C, HUZARSKI T, BYRSKI T, GRONWALD J, WOKOŁORCZYK D, NAROD SA, LUBŃSKI J. Synergistic interaction of variants in *CHEK2* and *BRCA2* on breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2009; **117**: 161–165.
- [41] ŚLIWIŃSKI T, BŁASIAK J. Naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów w komórkach ssaków. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 697–719.
- [42] ŚLIWIŃSKI T, BŁASIAK J. Naprawa DNA przez wycinanie zasad. *Post Bioch* 2005; **51**: 120–129.
- [43] ŚLIWIŃSKI T, KRUPA R, MAJSTEREK I, RYKAŁA J, KOŁACIŃSKA A, MORAWIEC Z, DRZEWO-SKI J, ZADROŻNY M, BŁASIAK J. Polymorphisms of the *BRCA2* and *RAD51* genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; **94**: 105–109.
- [44] THACKER J. The *RAD51* gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* 2005; **219**: 125–135.
- [45] THE BREAST CANCER ASSOCIATION CONSORTIUM. Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the breast cancer association consortium. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 1382–1396.

- [46] THOMPSON LH, SCHILD D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 2002; **509**: 49–78.
- [47] VARGA D, MICHEL I, PATINO-GARCIA B, PAISS T, VOGEL W, MAIER C. Radiosensitivity detected by the micronucleus test is not generally increased in sporadic prostate cancer patients. *Cytogenet Genome Res* 2005; **111**: 41–45.
- [48] VENKITARAMAN AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Science* 2001; **114**: 3591–3598.
- [49] WATAŁA C. Biostatystyka – wykorzystanie metod statystycznych w pracy badawczej w naukach biomedycznych. Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała: 2002: 155–172.
- [50] WEBB PM, HOPPER JL, NEWMAN B, CHEN X, KELEMEN L, GILES GG, SOUTHEY MC, CHENEVIX-TRENCH G, SPURDLE AB. Double-strand break repair gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**: 319–323.
- [51] WELLS RD. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem Sci* 2007; **32**: 271–278.
- [52] WETERINGS E, CHEN DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 2008; **18**: 114–124.
- [53] WOOD RD, MITCHELL M, LINDAHL T. Human DNA repair genes. *Mutat Res* 2005; **577**: 275–283.
- [54] YANG R, CHEN B, HEMMINKI K, WAPPENSCHMIDT B, ENGEL C, SUTTER C, DITSCH N, WEBER BH, NIEDERACHER D, ARNOLD N, MEINDL A, BARTRAM CR, SCHMUTZLER RK, BURWINKEL B. Polymorphisms in BRCA2 resulting in aberrant codon-usage and their analysis on familial breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2009; **118**: 407–413.
- [55] ZUKER M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 3406–3415.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 20.11. 2009 r.

Przyjęto: 03.01.2010 r.

Katarzyna Woźniak,

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki,

Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

e-mail: wozniak@biol.uni.lodz.pl