

Zwierzęta laboratoryjne w badaniach mutacji genu *BRCA1*

Aleksandra Dębska, Joanna Gruszczyńska

z Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Gen *BRCA1* został sklonowany w 1994 r. przez Miki i jego zespół (1). Gen ten znajduje się w długim ramieniu chromosomu 17 (17q21). Jest to duży gen obejmujący 80kbp DNA (2) i kodujący białko, składające się z 1863 aminokwasów (3). *BRCA1* jest genem supresorowym, kontrolującym cykl komórkowy poprzez takie mechanizmy, jak apoptoza i naprawa DNA. Jego rolą jest utrzymanie stałości genomu (3). Gen ten jest aktywatorem transkrypcji, stanowi element systemu naprawczego dwuniciowych pęknięć w DNA, a także uczestniczy w remodelowaniu chromatyny w kompleksie SWI/SNF (4). *BRCA1* zawiera dwa typy domen białkowych: palec RING przy N-końcu i dwie domeny BRCT na C-końcu (5). Domena RING wiąże białko BARD1, które w reakcji z białkiem *BRCA1* znosi mutacje w obrębie domeny RING *BRCA1*. Przypuszcza się, że to kompleks *BRCA1*-*BARD1* ma największy wpływ na proces nowotworzenia (4).

Rocznie około 12 tys. Polek choruje na raka piersi. Przyjmuje się, że w 30% przypadków przyczyną choroby są predyspozycje genetyczne, związane z mutacjami w genach *BRCA1* i *BRCA2*. U nosicieli mutacji w genie *BRCA1* ryzyko zachorowania na raka piersi wynosi od 50 do 80%, a raka jajnika około 40%. Nowotwory u tych osób pojawiają się zazwyczaj przed 50 rokiem życia.

W badaniach funkcji genu *BRCA1* jako zwierzęta laboratoryjne wykorzystano myszy, szczury, świnię domową, psy i kury. Jednak podstawowym zwierzęcym modelem doświadczalnym była mysz, ze względu na łatwość hodowli, a także znajomość genomu tego zwierzęcia (6). Gen *Brcal* u myszy znajduje się w chromosomie 11, koduje białko składające się z 1812 aminokwasów. Z badaniami prowadzonymi na myszach wiązano duże nadzieje, gdyż stwierdzono w 58% podobieństwo między białkiem *BRCA1* myszy i człowieka (7). Gen *Brcal* u tych gryzoni pełni bardzo ważną rolę podczas wczesnej embriogenezy, ma wpływ na rozwój listków zarodkowych i struktur nerwowych, a także na proliferację komórek (8).

Konwencjonalne modele myszy

Jednym z pierwszych modeli, wprowadzonych w celu badania genu *Brcal*, był

model z mutacją w eksonie 11 genu *Brcal*. Miejsce mutacji zostało wybrane przez Liu i wsp. (9) ze względu na to, że u człowieka to właśnie w eksonie 11 genu *BRCA1* najczęściej występują mutacje, prowadzące do zmian nowotworowych. Badacze zastosowali w reakcji PCR sekwencje starterowe eksonu 11 genu *BRCA1*, charakterystyczne dla człowieka, co doprowadziło do amplifikacji genu *Brcal* u myszy. W doświadczeniu otrzymano potomstwo, w którym wyróżniono 53% heterozygot i 47% homozygot o genotypie dzikim. Wszystkie myszy rozwijały się prawidłowo i były zdrowe (9). Ponieważ nie otrzymano żadnej homozygoty o genotypie *Brcal*(-/-), wykonano kojarzenie osobników heterozygotycznych, a następnie całe uzyskane potomstwo zgenotypowano. Wśród 97 przebadanych myszy nie otrzymano ani jednego osobnika z mutacją w obu allelach genu *Brcal*, co sugeruje letalność homozygot *Brcal*(-/-). Liu i wsp. (9) zbadali również, na jakim etapie życia płodowego zamierają embriony homozygotyczne *Brcal*(-/-) pod względem mutacji. Pobierali oni embriony od myszy w różnych etapach ciąży: od 4,5 do 7,5 dnia embrionalnego. Embriony badane przez Liu i wsp. (9) zamierały przed 8,5 dniem życia embrionalnego. W wyniku dalszych badań, odkryto, że przyczyną letalności embrionalnej homozygot *Brcal*(-/-) nie jest zwiększona apoptoza, ale zmniejszona zdolność do namnażania się komórek. Doświadczenia przeprowadzone na modelu myszy z mutacją w eksonie 11 genu *Brcal* wykazały niezwykle ważną funkcję, jaką gen *Brcal* pełni w rozwoju embrionalnym. Bierze on udział w procesach związanych z gastrulacją i różnicowaniem komórek (9).

Do podobnych wniosków doszedł Hakem i jego zespół (7), wykonujący doświadczenia na myszach z mutacją w obrębie eksonu 5 i 6 genu *Brcal*. W potomstwie myszy heterozygotycznych otrzymano, podobnie jak u Liu i wsp. (9), tylko osobniki heterozygotyczne *Brcal*(+/-) i homozygotyczne *Brcal*(+/+), co potwierdza letalność homozygot *Brcal*(-/-). W celu sprawdzenia wpływu usunięcia eksonu 5 i 6 na działanie genu *Brcal*, przeanalizowano zarodki, pochodzące z kojarzenia heterozygot. Hakem i współpracownicy (7) wysnuli z tych

BRCA1 gene mutations investigation in laboratory animals

Dębska A., Gruszczyńska J., Department of Genetics and Animal Breeding Faculty of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The purpose of this paper was to present the use of laboratory animals in studying the *BRCA1* gene mutations. Over the past 18 years, since the discovery of the *BRCA1* gene, the scientists working on new experimental models tweaked to make the most of their biology approach to the humans. Conventional and conditional mouse models have enabled researchers to describe the role of *BRCA1* in cell function. Genetic interactions between *BRCA1* gene and protein involved in DNA repair have also been discovered. Due to the high similarity of dog and pig biology to humans, these animal models offer the greatest hope for further research on *BRCA1* gene. Speaking of experimental animals we should, of course, remember that they are only research models which are as close as possible but not identical to the humans. Biology of mouse however, differs considerably from human. Further studies on *BRCA1* gene mutations in the context of tumor development and also cancer therapy related to this gene, have to follow. Models improvement and experimental work on adapting the therapy to the individual needs would give a great chance to help many patients having mutations in the *BRCA1* gene.

Keywords: *BRCA1* gene mutations, experimental models, laboratory animals.

badan wniosk, iż gen *Brcal* jest niezwykle ważny w okresie gastrulacji, gdyż zarodki homozygotyczne o genotypie *Brcal*(-/-) zamierały najpóźniej w 7,5 dniu życia embrionalnego, były również zdecydowanie mniej rozwinięte niż zarodki o genotypach: *Brcal*(+/+) i *Brcal*(+/-), były mniej zróżnicowane i posiadały liczne wady rozwojowe. Podobnie jak w doświadczeniu Liu i wsp. (9), letalność zarodków homozygotycznych była związana z obniżeniem zdolności komórek do proliferacji, a nie z apoptozą.

Kolejnym stworzonym modelem myszy był model *Brcal*^{ex2}, w którym usunięty został ekson 2 genu *Brcal*. Homozygotyczne zarodki *Brcal*(-/-), podobnie jak w przypadku innych modeli myszy, zamierały w życiu płodowym, jednak dożywały nawet 13,5 dnia życia płodowego, ale stwierdzono u nich liczne wady rozwojowe. Na etapie E8,5 były nadal bardzo słabo zróżnicowane, podczas gdy prawidłowo rozwijające się zarodki powinny mieć już wykształcone fałdy głowy. Osobniki heterozygotyczne, podobnie jak w przypadku wcześniej omówionych doświadczeń, były utrzymywane przez kilkanaście

miesiący, aby zbadać ich skłonność do zapadania na nowotwory. W doświadczeniu Ludwig i wsp. (10) osobniki o genotypie *Brcal*(+/-) były utrzymywane do ukończenia 15 miesiąca życia i żaden nie zachorował na nowotwór, co potwierdza tezę, że u myszy mutacje w genie *Brcal* nie predysponują do zachorowania na nowotwór sutka i jajnika (10).

Model myszy *Brcal*^{1700T}, utworzony przez Hohenstein i wsp. (11), zawiera mutację, polegającą na usunięciu z końca 3' genu *Brcal* domeny BRCT. Podobnie jak inne modele konwencjonalne myszy, charakteryzuje się on letalnością homozygot *Brcal*(-/-), jednak zarodki te rozwijają się i żyją dłużej. Ich rozwój był zauważalny nawet na etapie E9,5, a zarodki myszy *Brcal*^{1700T} wykształciły również mezoderme, w przeciwieństwie do innych modeli myszy doświadczalnych. U myszy heterozygotycznych nie stwierdzono obecności większej liczby guzów nowotworowych niż u myszy o fenotypie dzikim do osiągnięcia 2 roku życia. Potwierdza to teorię Ludwig i wsp. (10) o braku związku mutacji w genie *Brcal* u myszy z występowaniem u nich nowotworów sutka i jajników.

W 2001 r. Ludwig i jego zespół (12) wprowadzili 50 par zasad do eksonu 11 genu *Brcal*. Doświadczenie było wykonywane na myszach powstałych z krzyżowania szczepów C57BL/6J i 129/Sv. Takie tło genetyczne skutkowało otrzymaniem homozygot *Brcal*(-/-) po kojarzeniu ze sobą heterozygot. Osobników homozygotycznych było zdecydowanie mniej niż oczekiwali tego badacze, stanowiły one zaledwie 4%, podczas gdy powinno ich być około 25%. Było to spowodowane letalnością homozygot i licznymi wadami rozwojowymi zarodków. Badacze wykonali również krzyżowanie wsteczne z myszami 129/Sv lub MF1, które dało zaskakujące wyniki. Potomstwo było w 25% homozygotyczne pod względem mutacji w genie *Brcal*, co świadczy o braku zjawiska letalności homozygot. Jednakże myszy *Brcal*(-/-) wykazywały niewielkie opóźnienie rozwojowe, defekty w pigmentacji skóry, miały także zakręcone ogony, a samce były nieplodne. Spośród 89 homozygot u 76 myszy, oprócz nowotworów sutka i jajnika, pojawiły się także inne guzy nowotworowe. Średni wiek zachorowania myszy wynosił około 1,4 roku i nie stwierdzono wpływu płci na ich przeżywalność. Łącznie u wszystkich zwierząt wykryto 92 różnego rodzaju guzy, chłoniaki występowały u nich w wieku od 1 do 24 miesięcy, a pozostałe typy nowotworów stwierdzono tylko u osobników starszych niż 9 miesięcy. Model myszy *Brcal*^{Tr} jest konwencjonalnym modelem badawczym. Myszy te wprawdzie mają skłonność do zapadania na nowotwory, jednak schorzenia dotyczą

różnego rodzaju tkanek i narządów (13), podczas gdy u człowieka gen *BRCA1* związany jest z rakiem sutka i jajnika (1).

Myszy pochodzące z modelu *Brcal*^{S971A}, tak jak myszy *Brcal*^{Tr}, są zwierzętami ze skłonnościami do zachorowań na nowotwory. W wytworzeniu tego modelu wykorzystano związek między genem *BRCA1* a kinazą białkową CHK2. Oprócz występowania mutacji CHK2 w chorobach nowotworowych, związanych zespołem Li-Fraumeni, dowiedziono również, że mutacje genu *CHK2* występują w nowotworach, związanych z genem *BRCA1* (14). *CHK2* wpływa poprzez fosforylację na funkcjonowanie *BRCA1* po uszkodzeniu DNA. Kim i wsp. (14) zbadali zależność współdziałania *CHK2* i *BRCA1* na występowanie raka sutka. Badacze ci w tym celu wywołali mutacje w miejscu fosforylacji *CHK2* w genie *Brcal* – S971A. Po otrzymaniu myszy heterozygotycznych przeprowadzono kojarzenie w celu wytworzenia myszy homozygotycznych o genotypie *Brcal*(-/-). W pokoleniu potomnym otrzymano spodziewaną liczbę zwierząt, u których do ukończenia 12 miesiąca życia nie zaobserwowano żadnych wad rozwojowych ani też niepłodności. Dowodzi to braku wpływu mutacji w miejscu fosforylacji *CHK2* genu *Brcal* na rozwój myszy. Gdy myszy ukończyły 2 rok życia, przeprowadzono badanie 6 samic. U 4 z nich wykryto liczne rozgałęzienia gruczołów sutkowych z niewielkimi ogniskami rozrostowymi. U homozygotycznych samic zauważono również nieprawidłowy rozrost macicy z naciekami powiększonych naczyń krwionośnych.

W badaniu histologicznym wykryto również polipy, a u 3 samic w ogóle nie stwierdzono jajników, a jajniki pozostałych były nieprawidłowo zbudowane. U badanych myszy stwierdzono też obecność wątrobiaka i tłuszczaka. Wszystkie te dane potwierdzają skłonność myszy *Brcal*^{S971A} do zapadania na nowotwory (14). Ponieważ fosforylacja *CHK2* genu *BRCA1* następuje po uszkodzeniu DNA, Kim i wsp. (14) badali wpływ promieniowania gamma na zdrowie myszy. Zwierzęta naświetlane były niewielką dawką cztery razy w odstępach tygodniowych. U młodych myszy nie zaobserwowano żadnych nieprawidłowości, jednak u zwierząt o genotypie *Brcal*(-/-) w wieku 10–11 miesięcy wystąpił znaczny przyrost masy, w porównaniu z myszami o genotypie *Brcal*(+/-), zmienił się również kolor umaszczenia. W czasie 13 miesięcy po naświetlaniu u wszystkich osobników *Brcal*(-/-) zostały wykryte zmiany w gruczołach sutkowych. Proces nowotworowy wywołał promieniowaniem gamma rozpoczynał się u myszy *Brcal*(-/-) około trzeciego miesiąca życia. W wieku 12 miesięcy około 80% z nich miało guzy

nowotworowe. Spośród myszy o fenotypie dzikim tylko u 15% stwierdzono wystąpienie nowotworu.

Spośród opisanych modeli konwencjonalnych jedynie myszy *Brcal*^{Tr} i *Brcal*^{S971A} mają skłonności do zapadania na nowotwory. Tylko u myszy pochodzących z tych modeli udało się otrzymać zwierzęta homozygotyczne o genotypie *Brcal*(-/-). W przypadku pozostałych modeli występowało zjawisko letalności homozygot, co uniemożliwiało zbadanie wpływu mutacji w genie *Brcal* na występowanie zmian nowotworowych. Aby ominąć te problemy, rozpoczęto badania na warunkowych modelach myszy doświadczalnych (15).

Warunkowe modele myszy

Jednym z pierwszych modeli warunkowych był wytworzony przez Xu i wsp. (16) model myszy *Brcal*^{F11}. U tych myszy występowała mutacja w eksonie 11 genu *Brcal*, wytworzona poprzez otoczenie tego eksonu z miejscami loxP. Badacze wytworzyli myszy z allelem warunkowym (*Brcal*^{Co}), z allelem zerowym (*Brcal*^{Ko}) lub z transgenem Wap-Cre lub też MMTV-Cre. Transgen MMTV-Cre jest aktywny w wielu tkankach różnego rodzaju, natomiast WAP-Cre tylko w tkance nabłonkowej sutka. Zarówno użycie transgenu WAP-Cre, jak i MMTV-Cre, przy usunięciu fragmentu genu *Brcal* skutkowało nieprawidłowym rozwojem gruczołu sutkowego. Badano guzy u samic w różnych stadiach ciąży, a także w trakcie laktacji i inwolucji gruczołu. U samic, u których użyto transgenu WAP-Cre, stwierdzono większe zmiany w gruczole sutkowym niż u samic z transgenem MMTV-Cre.

Badanie metodą TUNEL gruczołów sutkowych wykazało, że 20% komórek pobranych z tych gruczołów podlega apoptozie, natomiast u samic o fenotypie dzikim apoptozie nie podlegała ani jedna komórka. W celu zbadania procesów nowotworowych skrzyżowano myszy o genotypie *Brcal*Ko/CoMMTV-Cre z myszami o genotypie *Brcal* Ko/CoWap-Cre. Wśród potomstwa młodszego niż 10 miesięcy nie wykryto żadnego guza nowotworowego, natomiast wśród myszy w wieku 10–13 miesięcy pojawiły się guzy w gruczołach sutkowych. Mimo pojawienia się nowotworów, badacze postawili hipotezę, iż musi istnieć jakiś inny czynnik powodujący zwiększenie zachorowalności, gdyż myszy chorowały w późniejszym wieku, a częstość zachorowań była mała. Kariotypowanie chromosomowe i badanie metodą FISH wykazały, że gen *Trp53* jest jednym z czynników genetycznych, które hamują progresję nowotworową u osobników z mutacją warunkową genu *Brcal* (16). Teoria ta została potwierdzona przez Brodie i wsp. (17),

którzy wykonywali doświadczenia na myszach $Brcal^{Co/Co}$; MMTV-Cre, będące heterozygotami pod względem mutacji w genie $p53$. U ponad połowy z nich wykryto guzy nowotworowe w gruczole sutkowym, podczas gdy u osobników bez mutacji w genie $p53$, ale ze zmienionym genem $Brcal$ było to zjawisko sporadyczne.

Również Liu i wsp. (18) badali rolę $BRCA1$ i $p53$ w powstawaniu nowotworów sutka, za pomocą modelu doświadczalnego $Brcal^{F5-13}$. Zauważono, że nowotwory związane z mutacjami w genie $BRCA1$ mają pewne charakterystyczne cechy, upodabniające je do raka sutka typu podstawnego, gdyż mają wysoki stopień proliferacji i skłonność do ekspansji. Liu i wsp. (18) pracowali na modelu myszy, u których zinktywowano równocześnie oba geny – $Brcal$ i $p53$. Dzięki udziałowi w procesie tworzenia tego modelu doświadczalnego, osobnika $K14cre$, u którego rekombinaza Cre działała na tkankę nabłonkową skóry i gruczołu sutkowego, otrzymane w potomstwie samice chorowały na raka skóry i sutka. Raka sutka zdiagnozowano u 80% samic o genotypie $K14cre$, $Brcal1F/F$, $p53F/F$, a średni wiek zachorowania wynosił 288 dni. Guzy nowotworowe tych myszy bardziej niż myszy z innych modeli przypominały nowotwór piersi u człowieka. Jest to prawdopodobnie najlepszy z dotychczas utworzonych modeli, ponieważ brak tu zjawiska letalności homozygot, a dorosłe osobniki chorują na nowotwory sutka, które zbliżone są do tych występujących u człowieka (18).

$BRCA1$ podlega silnej ekspresji podczas procesu produkcji limfocytów, jednak jego rola w tworzeniu tymocytów nie została jeszcze wyjaśniona. Mak i jego zespół (19) stworzyli model myszy, ze specyficzną dla limfocytów T mutacją w genie $Brcal$, wprowadzoną za pomocą systemu Cre/lox. Celem ich badań była eliminacja zjawiska letalności homozygot i zbadanie roli genu $Brcal$ w procesie dojrzewania limfocytów T (19). U myszy wywołano mutację polegającą na usunięciu eksonu 5 i 6, a gen $Brcal$ został zinktywowany w limfocytach T dzięki rekombinazie Cre, pod kontrolą promotora Lck, charakterystycznego dla limfocytów T. Badania wykazały, że myszy, które posiadały mutacje miały znacznie mniej tymocytów niż pozostałe osobniki, jednak ich grasice były zbliżonych rozmiarów. Mak i wsp. (19) potwierdzili, że mutacje w genie $Brcal$ mają negatywny wpływ na proliferację komórkową, a ubytki w tym genie blokują prawidłowy przebieg cyklu komórkowego (19).

Chandler i jej zespółowi (20) udało się wyeliminować zjawisko letalności homozygot poprzez wprowadzenie do heterozygotycznej myszy $Brcal^{1700T}$ sztucznego

chromosomu bakteryjnego (BAC). Badacze wykonywali doświadczenie na modelu myszy, zawierającym gen $BRCA1$ człowieka. Wszystkie homozygotyczne osobniki były płodne i rozwijały się prawidłowo, a do ukończenia 18 miesiąca życia nie wystąpił u nich żaden rodzaj nowotworu, co uniemożliwia badanie wpływu mutacji w genie $BRCA1$ na wystąpienie nowotworu (20).

Doświadczenia na szczurach

Chen i wsp. (21) po raz pierwszy sklonowali gen $Brcal$ u szczura. Gatunek ten jest ciekawym wyborem ze względu na szybką reakcję tych zwierząt na czynniki nowotworowe, takie jak naświetlanie czy związki chemiczne, a także ze względu na to, że u nich nowotwór gruczołu sutkowego ma inną etiologię niż wirusowa. Gen $Brcal$ szczura jest w 81% podobny do $BRCA1$ u człowieka, ale u tych gryzoni nie ma on znaczenia podczas rozwoju dziedzicznych postaci nowotworów gruczołu sutkowego, co potwierdzają badania Chen i wsp. (21) z użyciem DMBA i naświetlania (21).

BRCA1 u innych gatunków zwierząt: świni domowej, psa i kury

Gryznie są najczęściej wykorzystywanymi zwierzętami laboratoryjnymi, ze względu na łatwość utrzymania, szybkie tempo rozrodu i poznany w dużym stopniu ich genom (6). Za wyborem świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*) do doświadczeń przemawia zarówno zbliżony do genomu człowieka, jak i podobny proces rozwoju narządów, metabolizm i fizjologia. Stosunkowo długi czas życia daje szansę na zbadanie chorób występujących zwykle w zaawansowanym wieku, takich jak choroby zwyrodnieniowe, a także nowotwory. U świni domowej gen $BRCA1$ znajduje się w chromosomie 12 i zawiera 22 eksony, z których najważniejszy, 11 ekson jest homologiczny do eksonu 11 tego genu u człowieka. Zarówno u świni, jak i u człowieka białko $BRCA1$ składa się z 1863 aminokwasów, a sekwencja aminokwasowa u obu tych gatunków jest podobna w 74%. Luo i wsp. (22) wyprowadzili model świni miniaturowej, u której za pomocą transgenu rAAV usunięto ekson 11 genu $BRCA1$. Zmutowane komórki zostały u 3 loch wklonowane do macic. Urodziło się łącznie 8 prosiąt, z których jedno było w typie dzikim, a reszta była heterozygotami. Niestety wszystkie prosięta padły w ciągu 18 dni z powodu nieprawidłowego funkcjonowania genu $BRCA1$, co uniemożliwiło przeprowadzenie dalszych badań (22).

U psa (*Canis familiaris*) bardzo często występują nowotwory sutków. Zarówno

u człowieka, jak i u psa większość złośliwych guzów gruczołu sutkowego stanowią gruczolaki, wywodzące się z tkanki gruczolowej nabłonka, dające przerzuty głównie do okolicznych węzłów chłonnych i do płuc. Drugim ważnym podobieństwem jest zwykle zaawansowany wiek chorych. Potwierdzono wpływ mutacji w genach $BRCA1$ i $BRCA2$ na występowanie dziedzicznych postaci raka sutka u psów. Rivera i wsp. (23) badali szwedzką populację psów rasy angielski springer spaniel pod kątem występowania mutacji w genie $BRCA1$. Rasa ta została wybrana do badań ze względu na odnotowaną w tej rasie bardzo dużą (36%) zachorowalność na raka sutka. Badania, które przeprowadził Rivera i jego zespół (23) potwierdzają wpływ $BRCA1$ na występowanie nowotworu gruczołu sutkowego u psów. Jednak niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań ze względu na to, iż nieznanne są najczęstsze miejsca występowania mutacji, ani też mechanizmy funkcjonowania tego genu u psów.

Jedynym zwierzęciem, niebędącym ssakiem, którego gen $BRCA1$ udało się sklonować jest kura (*Gallus gallus*). Białko $BRCA1$ u kury składa się z 1749 aminokwasów i jest podobne do białka człowieka w 33%. Mimo niewielkiego podobieństwa, zachowane są powtórzenia BRCT i domena RING. Oznacza to, że struktury te są niezwykle ważne dla funkcjonowania genu $BRCA1$. Orelli i wsp. (24) odkryli w $BRCA1$ kury domowej 9 dodatkowych motywów, które mogą mieć duże znaczenie dla jego działania, głównie ze względu na wiązanie różnych białek, takich jak białko p53.

Terapia u nosicieli mutacji w genie BRCA1

W ciągu 15 lat od odkrycia genu $BRCA1$ nastąpił ogromny postęp w diagnostyce genetycznej. Pacjent, będący nosicielem mutacji w genie $BRCA1$ jest świadomy zagrożenia, dlatego poddawany jest regularnym i dokładnym badaniom, umożliwiającym wykrycie nowotworu we wczesnym stadium. Najbardziej skutecznym sposobem zapobiegania nowotworom związanym z mutacjami w genie $BRCA1$ jest profilaktyczne usunięcie zagrożonych narządów, co potwierdzają badania Rebbecka i wsp. (25). Narod i Offit (26) opisują, że na wystąpienie raka piersi u nosicieli mutacji w genie $BRCA1$ mają również wpływ inne czynniki, takie jak długość okresu karmienia piersią, liczba przebytych ciąży i wiek wystąpienia pierwszej miesiączki (26). Mimo braku receptorów estrogenowych w guzach związanych z mutacjami w genie $BRCA1$, dowiedziono, że są one podatne

na zmiany o charakterze hormonalnym (15). Potwierdzają to Narod i Offit (26), którzy zauważyli, że profilaktyczne usunięcie jajników u pacjentek z mutacją w genie *BRCA1* zmniejsza ryzyko zachorowania na raka piersi o 50%.

Ze względu na brak receptorów estrogenowych w guzach związanych z mutacjami w genie *BRCA1* terapia hormonalna nie powinna być skuteczna. Mimo to wykazano, że stosowanie tamoksyfenu, będącego modulatorem receptora estrogenowego, zmniejsza ryzyko zachorowania na nowotwory spowodowane zmianami w genie *BRCA1* (26). Poole i wsp. (27) dowiedli skuteczności stosowania inhibitora receptora progesteronu – mifeprestonu RU486 w profilaktyce raka gruczołu sutkowego u myszy *Brc1f11/f1 p53f5&6/f5&6Crec*. U wszystkich samic nowotwór gruczołu sutkowego pojawiał się przed ukończeniem 9 miesiąca życia, a po zastosowaniu mifeprestonu RU486 nie odnotowano zachorowania u żadnej samicy przed ukończeniem 12 miesiąca życia (27). Z substancją tą związane są jednak liczne kontrowersje, ponieważ u człowieka guzy związane z mutacjami w genie *BRCA1* są zwykle „potrójnie negatywne”, czyli nie wykazują ekspresji receptorów estrogenowych, progesteronowych i receptorów HER2, a ekspresja tych receptorów u badanych myszy nie została sprawdzona. Mifepreston RU486 jest oprócz tego antagonistą receptora glikokortykoidu i to z tą cechą może być związane zapobieganie nowotworzeniu (15).

„Potrójna negatywność” guzów związanych z mutacjami w genie *BRCA1* oznacza, że nosiciele tych mutacji są oporni na terapię hormonalną, a także na terapię ukierunkowaną na HER2, takie jak lapatinib. Powszechnie stosowane w chemioterapii środki są niestety wysoce cytotoksyczne. Nie ma więc odpowiedniej terapii dla osób z mutacją w genie *BRCA1*, dlatego są one leczone tradycyjną chemioterapią z wykorzystaniem antracyklin i taksanów, co z początku daje dobre efekty, jednak często pojawiają się nawroty choroby (28).

Obecnie trwają badania nad inhibitorami PARP (polimeraza ADP-rybozy), które wykorzystują w swoim działaniu współpracę między genami. Jedną z najważniejszych funkcji genu *BRCA1* jest bezbłędna naprawa uszkodzeń obu nici łańcucha DNA za pomocą rekombinacji homologicznej. Komórki, w których występuje mutacja są pozbawione tej zdolności, stąd koncepcja, żeby wywołać syntetyczną letalność tych komórek za pomocą leków, które bezpośrednio lub pośrednio wywoływałyby uszkodzenia obu nici. Syntetyczna letalność jest zjawiskiem śmierci komórki wywołanej przez mutacje w 2 genach naraz, jednakże żaden

z tych genów osobno nie spowodowałby śmierci danej komórki. Wykorzystując ten fakt w leczeniu nowotworów, można by było wyeliminować tylko komórki zmienione nowotworowo, nie uszkadzając prawidłowych, gdyż one miałyby uszkodzony tylko jeden gen (29). W ostatnich latach wykazano, że na leczenie PARP podatne są zarówno guzy związane z mutacjami w genach *BRCA1* lub *BRCA2*, jak i sporadyczne przypadki zachorowań na inne nowotwory. PARP stosowany z gemcitabiną i karboplatiną zwiększa szansę przeżycia pacjentów z przerzutami (28). Podobne działanie do PARP mają związki oparte na platynie, takie jak cisplatyna czy karboplatyna, jednak ich ogromną wadą jest wysoka toksyczność i mała dostępność biologiczna w przypadku podania doustnego. Ponadto możliwe jest nabycie oporności na cisplatynę (30), choć jest to zależne od wielkości mutacji w genie *BRCA1* (28). U ludzi mutacje w genie *BRCA1* występują w różnych miejscach i mają różny zakres, dlatego leczenie chorych powinno być bardziej spersonalizowane, gdyż u każdego człowieka efekt leczenia może być inny.

Piśmiennictwo

- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P. A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L. M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P. K., Norris F. H., Helvering L., Morrison P., Rostek P., Lai M., Barrett J. C., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A., Skolnick M. H.: A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene *BRCA1*. *Science* 1994, **266**, 66-71.
- Hall J. M., Lee M. K., Newman B., Morrow J. E., Anderson L. A., Huey B., King M. C.: Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990, **250**, 1684-1689.
- Kubista M., Rosner M., Miloloza A., Hofer K., Prusa A., Kroiss R., Marton E., Hengstschlager M.: *BRCA1* and differentiation. *Mutat. Res.* 2002, **512**, 165-172.
- Lee J. S., Chung J. H.: Diverse functions of *BRCA1* in the DNA damage response. *Expert Rev. Mol. Med.* 2001, **3**, 1-11.
- Kim S. S., Cao L., Lim S. C., Li C., Wang R. H., Xu X., Bachelier R., Deng C. X.: Hyperplasia and spontaneous tumor development in the gynecologic system in mice lacking the *BRCA1*- $\Delta 11$ isoform. *Mol. Cell. Biol.* 2006, **26**, 6983-6992.
- Brylińska J., Kwiatkowska J.: *Zwierzęta laboratoryjne – metody hodowli i doświadczeń*. Wyd. Universitas, Kraków 1996, s. 11-30.
- Hakem R., de la Pompa J. L., Sirard C., Mo R., Woo M., Hakem A., Wakeham A., Potter J., Reitman A., Billia E., Firpo E., Hui C. C., Roberts J., Rossant J., Mak T. W.: The tumor suppressor gene *Brc1* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 1996, **88**, 1009-1023.
- O'Connell F. C., Martin F.: Laminin-rich extracellular matrix association with mammary epithelial cells suppresses *Brc1* expression. *Cell Death Differ.* 2000, **7**, 360-367.
- Liu C. Y., Fleksen-Nikitin A., Li S., Zeng Y., Lee W. H.: Inactivation of the mouse *Brc1* gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes Dev.* 1996, **10**, 1835-1843.
- Ludwig T., Chapman D. L., Papaioannou V. E., Efstratiadis A.: Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brc1*, *Brc2*, *Brc1/Brc2*, *Brc1/p53*, *Brc2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev.* 1997, **11**, 1226-1241.
- Hohenstein P., Kielman M. K., Breukel C., Bennett L. M., Wiseman R., Krimpenfort P., Cornelisse C., van Ommen G. J., Devilee P., Fodde R.: A targeted mouse *Brc1* mutation removing the last *BRCT* repeat results in apoptosis and embryonic lethality at the headfold stage. *Oncogene* 2001, **20**, 2544-2550.
- Ludwig T., Fisher P., Ganesan S., Efstratiadis A.: Tumorigenesis in mice carrying a truncating *Brc1* mutation. *Genes Dev.* 2001, **15**, 1188-1193.
- Hohenstein P., Fodde R.: Of mice and (wo)men: genotype-phenotype correlations in *BRCA1*. *Hum. Mol. Genet.* 2003, **12**, 271-277.
- Kim S. S., Cao L., Li C., Xu X., Huber L. J., Chodosh L. A., Deng C. X.: Uterus hyperplasia and increased carcinogen-induced tumorigenesis in mice carrying a targeted mutation of the *Chk2* phosphorylation site in *Brc1*. *Mol. Cell. Biol.* 2004, **24**, 9498-9507.
- Drost R.M., Jonkers J.: Preclinical mouse models for *BRCA1* – associated breast cancer. *Br. J. Cancer* 2009, **101**, 1651-1657.
- Xu X., Wagner K. U., Larson D., Weaver Z., Li C., Ried T., Hennighausen L., Wynshaw-Boris A., Deng C. X.: Conditional mutation of *Brc1* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nature genetics* 1999, **22**, 37-43.
- Brodie S. G., Xu X., Qiao W., Li W. M., Cao L., Deng C. X.: Multiple genetic changes are associated with mammary tumor genesis in *Brc1* conditional knockout mice. *Oncogene* 2001, **20**, 7514-7523.
- Liu X., Holstege H., van der Gulden H., Treur-Mulder M., Zevenhoven J., Velds A., Kerkhoven R. M., van Vliet M. H., Wessels L. F. A., Peterse J. L., Berns A.: Somatic loss of *BRCA1* and *p53* in mice induces mammary tumors with features of human *BRCA1*-mutated basal-like breast cancer. *PNAS* 2007, **29**, 12111-12116.
- Mak T. W., Hakem A., McPherson J. P., Shehabeldin A., Zabolocki E., Migon E., Duncan G. S., Bouchard D., Wakeham A., Cheung A., Karaskova J., Sarosi I., Squire J., Marth J., Hakem R.: *Brc1* required for T cell lineage development but not TCR loci rearrangement. *Nature* 2000, **1**, 77-82.
- Chandler J., Hohenstein P., Swing D. A., Tessarollo L., Sharan S. K.: Human *BRCA1* gene rescues the embryonic lethality of *Brc1* mutant mice. *Genesis* 2001, **29**, 72-77.
- Chen K. S., Shepel L. A., Haag J. D., Heil G. M., Gould M. N.: Cloning, genetic mapping and expression studies of the rat *Brc1* gene. *Carcinogenesis* 1996, **17**(8), 1561-1566.
- Luo Y., Li J., Liu Y., Lin L., Du Y., Li S., Yang H., Vajta G., Callesen H., Bolund L., Sorensen C. B.: High efficiency of *BRCA1* knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. *Transgenic Res.* 2011, **20**, 975-988.
- Rivera P., Melin M., Biagi T., Fall T., Häggström J., Lindblad-Toh K., von Euler H.: Mammary tumor development in dogs is associated with *BRCA1* and *BRCA2*. *Cancer Res.* 2009, **69**, 8770-8774.
- Orelli B. J., Logsdon Jr J. M., Bishop D. K.: Nine novel conserved motifs in *BRCA1* identified by the chicken orthologue. *Oncogene* 2001, **20**, 4433-4438.
- Rebbeck T. R., Kauff N. D., Domcheck S. M.: Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009, **2**, 80-87.
- Narod S. A., Offit K.: Prevention and management of hereditary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005, **23**, 1656-1663.
- Poole A. J., Li Y., Kim Y., Lin S. C. J., Lee W. H., Lee E. Y. H. P.: Prevention of *Brc1*-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. *Science* 2006, **314**, 1467-1470.
- Michalak E. M., Jonkers J.: Studying therapy response and resistance in mouse models for *BRCA1*-deficient breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2011, **16**, 41-50.
- Ashworth A.: A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J. Clin. Oncol.* 2008, **22**, 3785-3790.
- Shafee N., Smith C. R., Wei S., Kim Y., Mills G. B., Hortobagyi G. N., Stanbridge E. J., Lee E. Y. H. P.: Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in *Brc1/p53* – mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 2008, **68**, 3243-3250.

Dr Joanna Gruszczynska,
e-mail: joanna_gruszczynska@sggw.pl