

W pracy przedstawiono podstawowe mechanizmy nieprawidłowości (amplifikację genów, mutacje punktowe i delecje, zaburzenia ekspresji genów) wiodących do onkogennej aktywacji receptorowych kinaz tyrozynowych rodziny ErbB (HER) oraz techniki badania tych zaburzeń. Część I obejmuje zjawisko amplifikacji genów rodziny ErbB (HER) i metody najczęściej stosowane do jego detekcji.

Słowa kluczowe: onkogeny, receptory ErbB (HER), amplifikacja genów, ilościowe techniki PCR.

The paper reviews mechanisms (gene amplifications, point mutations and deletions, gene expression alterations) leading to excessive activity of the ErbB (HER) family receptor tyrosine kinases, as well as techniques used in the research on these anomalies. Part I shortly describes the phenomenon of ErbB (HER) family gene amplification and methods used for its determination.

Key words: oncogenes, ErbB (HER) receptors, gene amplification, quantitative PCR.

Zaburzenia funkcji receptorów *ErbB* (*HER*): mechanizmy i metody badania

Część I. Amplifikacja genów rodziny *ErbB* (*HER*)

Anomalies of ErbB (HER) receptor functions: mechanisms and methods of detection.

Part I. Gene amplification of ErbB (HER) family

Krzysztof P. Bielawski¹, Ulf Vogt², Burkhard H. Brandt³, Bogdan Falkiewicz^{1, 4}

WSTĘP

Klasę I receptorowych kinaz tyrozynowych stanowią receptory epidermalnych czynników wzrostowych, zwane rodziną receptorów ErbB, które wydają się szczególnie ważne w rozwoju prawidłowych tkanek różnych typów oraz rozwoju procesów nowotworowych w tkankach pochodzenia epidermalnego. Ich budowa i funkcja zostały wstępnie omówione w poprzednim artykule [1]. Opisano 4 rodzaje receptorów należących do tej grupy:

- ▶ EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, znany także jako ErbB-1,
- ▶ ErbB-2 (jego odpowiednik u gryzoni nosi nazwę NEU),
- ▶ ErbB-3,
- ▶ ErbB-4.

Ludzkie receptory tego typu często nazywane są odpowiednio *HER1*, *HER2*, *HER3* i *HER4*. Spośród nich, ErbB-1 i -2 są onkoproteinami, natomiast ErbB-3 i -4 białkami o prawdopodobnej funkcji onkogennej [2–4]. Niektóre zaburzenia jakościowe i ilościowe w funkcjonowaniu kinaz tej rodziny zostały definitywnie określone jako ściśle związane z powstawaniem, rozprzestrzenianiem i odpowiedzią nowotworów na leczenie, co do wielu innych istnieje takie przypuszczenie [5].

Stała aktywacja kinaz receptorowych, prowadząca do nadmiernej aktywacji wiodącego przez nie szlaku sygnalizacyjnego, może być wynikiem różnorodnych zaburzeń. W uproszczeniu podzielić je można na 3 grupy [5]:

- 1) mutacje wiodące do konstytutywnej aktywności kinazy, niezależnej od liganda i nie poddającej się inhibicji,
- 2) autokrywna aktywacja kinazy (produkowa-

nej w prawidłowych ilościach) przez wytwarzany przez komórkę w nadmiarze ligand lub nadekspresja kinazy w obecności wytwarzanego przez komórkę liganda,

3) inne zaburzenia w procesach regulujących aktywność szlaku wiodącego poprzez kinazę receptorową, np. dezaktywacja odpowiedniej fosfatazy.

Na powyższe procesy składać się mogą różne zmiany genetyczne i zaburzenia w procesach biochemicznych. Oprócz powyższych, występują także nieprawidłowości o nie wyjaśnionym dotychczas szczegółowo mechanizmie, być może odpowiadające częściowo punktowi 1., np. związek ekspresji wariantów mRNA genów *ErbB*, powstających w wyniku alternatywnego składania, z onkogenezą [6] czy zdolnością raka piersi do przerzutowania [7]. Nieprawidłowości te i metody ich badania zostaną bliżej omówione w tym i następnym artykułach. Należy podkreślić, że znaczenie każdego z nich w onkogennej aktywacji poszczególnych receptorów *ErbB* jest wyraźnie różne.

Jak się wydaje, najczęstszym spośród wymienionych mechanizmów jest nadekspresja kinazy. U jej podłoża leżeć może zjawisko amplifikacji (zwielokrotnienia) liczby kopii genu kinazy w komórce i/lub zjawisko nadmiernej aktywności procesów ekspresji kinazy przy obecności jednego (bez amplifikacji) lub większej (z amplifikacją) liczby kopii jej genu w komórce.

AMPLIFIKACJA GENÓW RODZINY *ErbB*

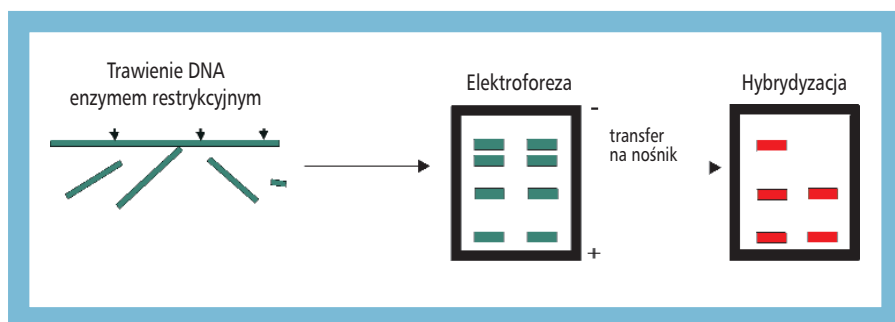
Amplifikacja sekwencji DNA jest procesem, w którym selektywnie wzrasta ilość kopii określonej części DNA komórki [8, 9]. Zjawisko to dotyczy głównie 2 grup genów: genów warunkujących oporność na leki oraz protoonkogenów komórkowych. Każ-

¹ Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Międzuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku

² European Laboratory Association, Section Ibbenbüren, Ibbenbüren, Germany

³ Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, Germany

⁴ Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego



Ryc. 1. Hybrydyzacja metodą Southerna

da jednostka zamplifikowanej sekwencji DNA (amplikon) może mieć wielkość od kilkuset tys. do kilku mln par zasad. Amplikony zwykle zorganizowane są w ciągi, ułożone jeden za drugim. Stwierdza się czasami obecność 1–2 powtórzeń, lecz w literaturze opisano także przypadki nowotworów niosących w komórkach ponad 1 tys. kopii onkogenu [10]. Zamplifikowane geny są zlokalizowane albo w chromosomach, zwykle wewnątrz szczególnej postaci fragmentów chromatyny, znanych jako regiony o zatartej strukturze prążkowej HSR (ang. *homogeneously staining regions*) lub ABR (ang. *abnormally banded regions*), albo też pozachromosomalnie, jako submikroskopowe koliste fragmenty DNA lub znacznie większe, widoczne w mikroskopie świetlnym, autonomiczne, episomalne fragmenty DNA pozbawione centromerów, tzw. małe dodatkowe chromosomy lub malutkie chro-

mosomy, zwane M (ang. *minute*) lub DM (ang. *double minute*) [8].

Regiony HSR mogą wykazywać wysoką złożoność, nie będąc prostą amplifikacją genów jednego chromosomu. Ich występowanie stwierdzono w blisko 60 proc. guzów sutka analizowanych bezpośrednimi technikami cytogenetycznymi [11]. W wielu ludzkich nowotworach następuje amplifikacja określonych protoonkogenów, przy czym najczęściej ulegają amplifikacji geny *c-myc*, *N-myc*, *c-myb*, *K-ras/N-ras*, *H-ras*, *ets-1*, *c-abl*, *Hist-1/Int-2*, geny rodziny *ErbB* [9, 11, 12].

Nie wiadomo, dlaczego występują 2 formy amplifikowanego DNA. Nie są też do końca poznane mechanizmy prowadzące do powstawania zwiększonej liczby kopii określonego genu. Najbardziej prawdopodobny wydaje się model zakładający inicjujący proces amplifikacji, pęknięcie jednej nici DNA w chromosomie. W prawidłowej

komórce powstają jednoniciowe przerwy w DNA, prawdopodobnie jako wynik naturalnych procesów replikacji i rekombinacji, jednak dalsza replikacja zostaje zatrzymana do momentu naprawy uszkodzeń. Funkcję regulującą cykl komórkowy pełni tu m.in. białko p53. Gdy jest ono uszkodzone lub go brak, replikacja uszkodzonych nici biegnie dalej, mimo obecności pęknięć w jednej nici DNA, generując pełne dwuniciowe pęknięcia chromosomów [9]. Wg koncepcji Von Hoffa, ulegające w tych warunkach delekcji fragmenty DNA tworzą koliste episomy, które z kolei mogą bądź multimeryzować, formując chromosomy DM, bądź ponownie integrować do chromosomów [8]. Chromosomy DM także mogą integrować do chromosomów, tworząc regiony o zatartej strukturze prążkowej [8].

Chociaż amplifikacja genów generalnie umożliwia komórkom wytwarzanie dużych ilości kodowanego w amplifikowanym regionie RNA i/lub białka [8], nadekspresja genów nie zawsze wymaga ich amplifikacji, co więcej, niejednokrotnie stwierdza się występowanie zjawiska amplifikacji bez równoczesnej nadekspresji amplifikowanego onkogenu. Z drugiej strony, amplifikowane sekwencje DNA są potencjalnym celem terapeutycznym; w niektórych przypadkach obserwowano eliminację chromosomów DM z nowotworowych linii komórkowych i ich różnicowanie w wyniku zastosowania siarczianu dimetylu (DMSO) lub hydroksymocznika [13].

Oprócz amplifikacji genów znaleziono dowody, że także duplikacja części sekwencji genu (np. topoizomerazy I) na poziomie DNA lub RNA i wytwarzanie w jej wyniku przez komórki nowotworowe zmodyfikowanych białek o większej masie cząsteczkowej, może być odpowiedzialna za oporność komórek nowotworowych na środki terapeutyczne działające poprzez inhibicję tych białek [14].

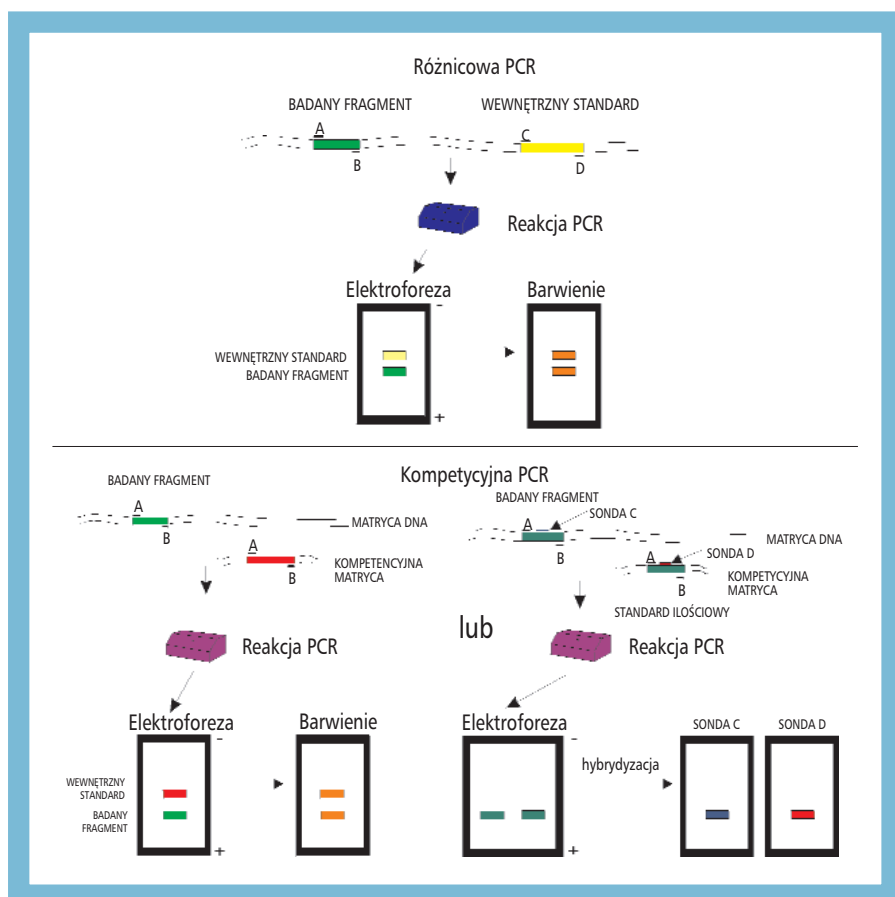
Metody detekcji zjawiska amplifikacji genów

Badania występowania amplifikacji w postaci regionów o zatartej strukturze prążkowej HSR lub chromosomów DM można wykonać technikami cytogenetycznymi, szczególnie bezpośrednimi, gdyż w czasie prowadzenia hodowli zmniejsza się ilość komórek nowotworowych zawierających te zaburzenia [11]. Techniki te nie będą w tej pracy szerzej omawiane, zostały bowiem niedawno doskonale przedstawione [15, 16]. Badania ilościowe amplifikacji genów przeprowadza się głównie technikami hybrydyzacyjnymi lub różnymi odmianami ilościowej techniki PCR [17, 18].

Techniki hybrydyzacyjne

Wśród technik hybrydyzacyjnych do oznaczania amplifikacji wciąż stosuje się klasyczną hybrydyzację wg Southerna [19, 20], która polega na (kolejno):

▶ cięciu wyizolowanego DNA odpowiednim enzymem restrykcyjnym,



Ryc. 2. Porównanie różnicowej i kompetycyjnej techniki PCR

- ▶ elektroforetycznym rozdziale w żelu agarozowym uzyskanych fragmentów pod względem ich długości,
- ▶ przeniesieniu rozdzielonych fragmentów na błonę (filtr) nitrocelulozową lub nylonową,
- ▶ hybrydacji sekwencyjnie specyficznych w stosunku do poszukiwanych sekwencji genów, znakowanych radioaktywnie (generalnie większa czułość) lub niezotopowo (generalnie mniejsza czułość) sond oligonukleotydowych do odpowiednich fragmentów DNA znajdujących się na filtrze [21].

Sygnały (radioaktywność, sygnał barwny lub fluorescencja, w zależności od sposobu wyznakowania zastosowanej sondy) odpowiadające genowi badanemu i kontrolnemu (nie ulegającemu amplifikacji, jako kontrolę stosuje się także zdrową tkankę) są następnie mierzone i porównywane, co pozwala na oznaczenie stopnia amplifikacji lub delecji badanego genu.

Coraz częściej w badaniach amplifikacji znajdują zastosowanie techniki hybrydacji *in situ*, w tym najczęściej fluorescencyjna hybrydacja *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) [15, 22, 23]. W technikach tych hybrydację przeprowadza się bezpośrednio na odpowiednio przygotowanym materiale tkankowym, bez konieczności wcześniejszej izolacji i transferu zawartego w nim DNA na błony nitrocelulozowe czy inny nośnik [24, 25].

Techniki amplifikacyjne

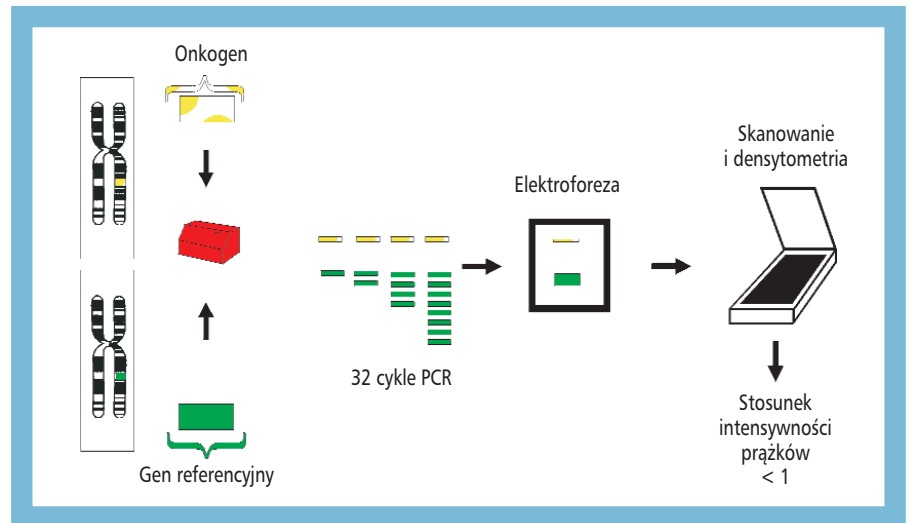
Spośród technik PCR, w badaniach amplifikacji genów zastosowanie znajdują różne odmiany ilościowej reakcji PCR (ang. *quantitative PCR*, qPCR), której celem jest oszacowanie liczby cząsteczek matrycy w badanej próbce [17, 18]. Decyzja o wyborze konkretnego wariantu pomiarów ilościowych zależy od kilku czynników, z których najistotniejsze to:

- ▶ rodzaj matrycy, której liczba kopii ma być zbadana,
- ▶ wymagana dokładność pomiaru,
- ▶ wymagany sposób oszacowania ilości: w wartościach bezwzględnych bądź też względem standardu.

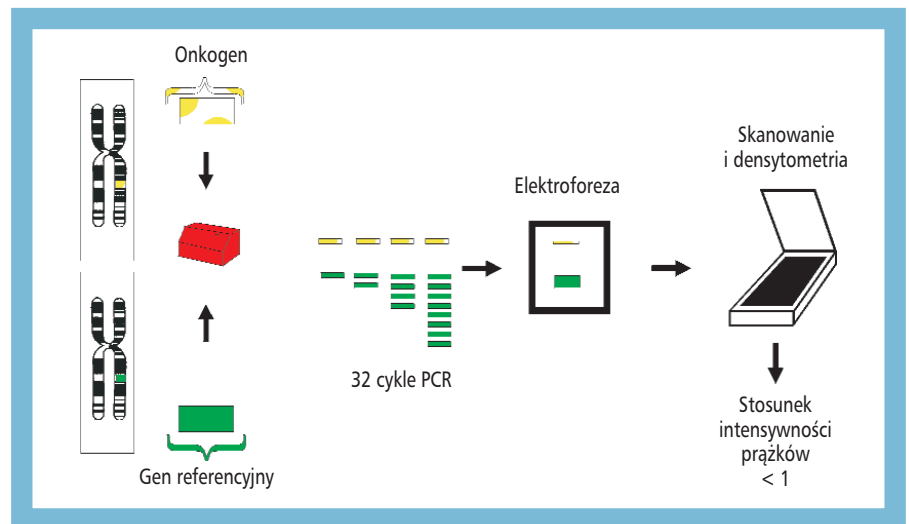
Spośród metod pomiaru liczby kopii badanej sekwencji kwasów nukleinowych, najszersze zastosowanie znajdują: metoda różnicowej PCR (ang. *differential PCR*, dPCR), w tym odmiana różnicowa techniki PCR TaqMan z zastosowaniem sond fluorescencyjnych i metoda kompetycyjnej PCR (ang. *competitive PCR*, cPCR).

Różnicowa PCR

Metoda równoczesnej amplifikacji badanego genu i fragmentu genu kontrolnego, określana terminem różnicowej techniki PCR (dPCR), została opisana w 1989 r. przez Frye'a i wsp. [26] w badaniach amplifikacji onkogenów; następnie wielokrotnie optymalizowana [27–33]. Zakłada ona zastosowanie wewnętrznego standardu w postaci równoczesnego powielania frag-



Ryc. 3. Różnicowa PCR w badaniu protoonkogenu w prawidłowej tkance, nie wykazującej zjawiska amplifikacji bądź delecji genu



Ryc. 4. Wykrywanie delecji genu w tkance raka piersi za pomocą metody różnicowej PCR

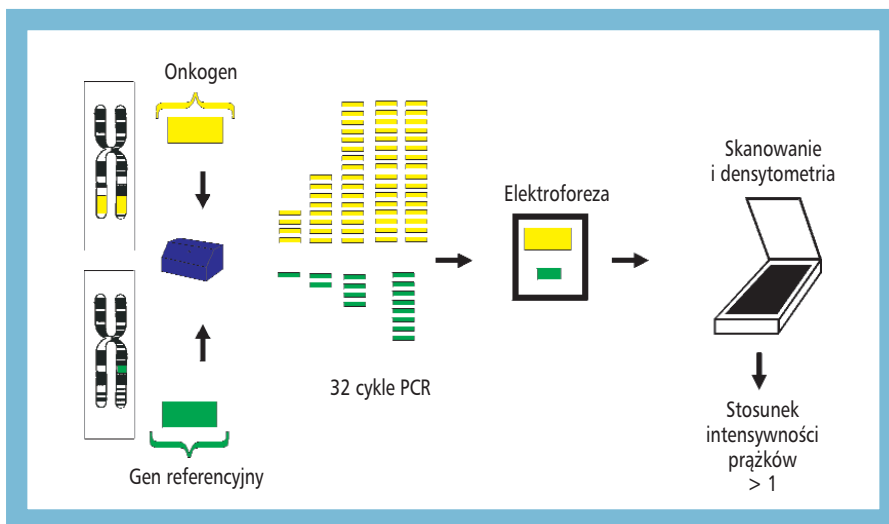
mentu badanego DNA i fragmentu DNA z innego miejsca tej samej matrycy (DNA komórki). Reakcja zachodzi przy udziale 2 par starterów oligonukleotydowych w tym samym naczyniu reakcyjnym:

- ▶ 1. pary dla sekwencji docelowej amplifikowanego onkogenu,
- ▶ 2. pary dla sekwencji genu referencyjnego (np. ludzkiej β -globiny).

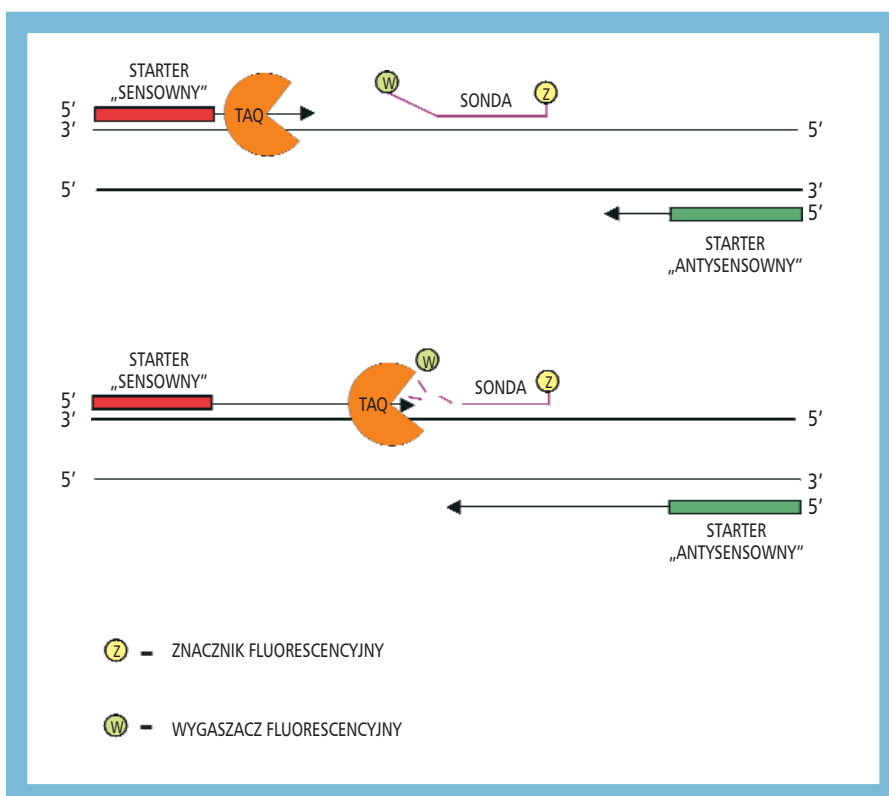
Na geny referencyjne wybierane są geny, które zwykle nie ulegają w komórkach modyfikacjom. Metoda ta spełnia swoje zadanie wówczas, gdy obie sekwencje amplifikowane są ze zbliżoną wydajnością, co wcześniej ustala się empirycznie przez staranne dobranie kombinacji par primerów. W wyniku wspólnej amplifikacji uzyskuje się 2 produkty PCR, które następnie analizowane są poprzez rozdział w żelu poliakrylamidowym lub agarozowym. Oznaczenie ilości sekwencji badanej w próbce możliwe jest dzięki porównaniu ilości produktów reakcji PCR sekwencji badanej i kontrolnej, powstających na danej matrycy, za pomocą szeregu różnych metod [17, 34], m.in.:

- ▶ pomiaru ilości DNA w żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydy, przy pomocy densytometru laserowego,
- ▶ pomiaru scyntytacji znakowanych radioaktywnie produktów PCR,
- ▶ wbudowania do produktu PCR znacznika fluorescencyjnego i późniejszego odczytu fluorymetrycznego,
- ▶ oznaczenia kolorymetrycznego produktów PCR, unieruchomionych na filtrze, po hybrydacji z oligonukleotydami znakowanymi np. digoksygeniną,
- ▶ wizualnego porównania ze wzorcami.

W efekcie uzyskuje się informację o stosunku ilościowym fragmentów DNA będących produktami PCR. W różnicowej technice PCR nie mierzymy bezwzględnej liczby kopii określonego onkogenu w komórce czy próbce, tylko jej stosunek do liczby kopii genu referencyjnego, w postaci tzw. średniej (dla badanej w próbce liczby komórek) liczby kopii genu (ang. *average gene copy number*, AGCN). W przypadku nie zmienionej tkanki, AGCN wynosi 1 (ryc. 3.). Jeśli natomiast stosunek ilościowy obu produktów dPCR nie jest



Ryc. 5. Wykrywanie amplifikacji genu w tkance raka piersi za pomocą metody różnicowej PCR



Ryc. 6. Technika TaqMan ilościowej reakcji PCR

równy 1 (ryc. 4., 5.) mówimy o zjawisku delecji (wartość AGCN < 1) lub amplifikacji (wartość AGCN > 1) genu badanego.

Różnicowa PCR została dotychczas kilkakrotnie zmodyfikowana, w celu uzyskania dokładniejszych wyników ilościowych. Już najprostsze zastosowanie seryjnych rozcieńczeń próbki badanej (badanego DNA komórkowego) w kontroli DNA referencyjnego jako matrycy do przeprowadzenia reakcji dPCR umożliwia dokładniejszą ocenę AGCN [35]. Podwójna różnicowa technika PCR (ang. *double-differential PCR*, ddPCR) [36] charakteryzuje się zastosowaniem podczas powielania DNA 2 genów referencyjnych, wy-

stępujących w organizmie ludzkim w pojedynczej liczbie kopii oraz genu badanego. Oprócz fragmentu genu badanego, powielaniu w reakcji ddPCR poddawane są fragmenty np. genu β -globiny (*HBB*) i genu ludzkiej dysmutazy nadadtlenkowej (*SOD2*). W każdym oznaczeniu, w identycznych warunkach reakcyjnych, stosuje się obok amplifikacji w 1 próbówce onkogenów razem z 1 genem referencyjnym, kontrolę w postaci amplifikacji w 2. próbówce obu genów referencyjnych (β -globina i dysmutaza nadadtlenkowa). Analizując produkty reakcji ddPCR, przede wszystkim szacuje się stosunek ilości powstałych fragmentów DNA obu genów referencyjnych. Wartość

1:1 świadczy o prawidłowym zaprojektowaniu i stężeniu primerów w reakcji oraz zrównoważonym przebiegu reakcji PCR. Technika ddPCR pozwala uzyskiwać powtarzalne wyniki amplifikacji DNA ze 100 ng-1 μ g tkanki raka sutka, a koszty jej zastosowania w rutynowym laboratorium diagnostycznym są około 20-krotnie niższe niż w przypadku hybrydizacji metodą Southerna [4, 37, 38]. W 1999 r. Beckmann i wsp. wprowadzili bezpośrednią różnicową technikę PCR (ang. *direct-double-differential PCR*, dddPCR) [39]. Modyfikacja opiera się na zastosowaniu wspólnego powielania sekwencji badanej i 2 sekwencji genów referencyjnych w 1 naczyniu reakcyjnym, przy czym powielane fragmenty sekwencji genów referencyjnych są odpowiednio: 1. dłuższy, 2. krótszy od powielanego fragmentu genu badanego. Umożliwia to w znacznym stopniu eliminację błędów wynikających z nierównomiernego powielania matryc o różnych długościach. Zastosowanie w tej technice fluorescencyjnie znakowanych primerów, rozdzielenia produktów PCR za pomocą elektroforezy kapilarnej i prostego wzoru matematycznego, pozwala na dokładne wyznaczenie AGCN genu badanego, także w częściowo zdegradowanym materiale (np. DNA izolowane z tkanek utrwalonych w parafinie), jednak cena oznaczenia jest wyższa niż w przypadku standardowej ddPCR [39].

Różnicowa odmiana techniki PCR TaqMan z zastosowaniem sond fluorescencyjnych

Różnicowa wersja techniki PCR TaqMan (ryc. 6.) [18] z zastosowaniem sond fluorescencyjnych jest techniką stosunkowo nową, szybko też została zastosowana do oznaczeń amplifikacji genów rodziny *ErbB* [40–42]. Podstawą metody jest zastosowanie w reakcji PCR polimerazy Taq z *Thermus aquaticus* oraz nie ulegającej amplifikacji sondy oligonukleotydomowej o sekwencji komplementarnej do sekwencji powielanego fragmentu genu. Sonda ta znakowana jest kowalencyjnie na końcu 5' znacznikiem fluorescencyjnym (np. 6-karboksyfluoresceiną), zaś na końcu 3' wygaszaczem fluorescencyjnym (np. 6-karboksytetrametylorodaminą), odpowiednio dobranym do tego znacznika. W tak skonstruowanej sondzie, dopóki znacznik fluorescencyjny i wygaszacz znajdują się stosunkowo blisko siebie, po wzbudzeniu znacznika duża część energii fluorescencji pochłaniana jest przez wygaszacz, w wyniku transferu energii typu Förstera. W trakcie reakcji PCR sondy hybrydują do komplementarnej sekwencji powielanych fragmentów DNA. Jeżeli zachodzi amplifikacja PCR, polimeraza Taq degradowuje zhybryzowane sondy w wyniku swojej aktywności 5'-egzonukleazy, co uwalnia znacznik fluorescencyjny od sąsiedztwa wygaszacza. Wzbudzenie znacznika odpowiednim impulsem laserowym wyzwala wówczas znacznie silniejszą fluorescencję, która może być mierzona fluorymetrycznie. Oczywiście, im więcej powielonych fragmentów i im wydaj-

niejszy przebieg reakcji PCR, tym więcej zdegradowanych sond i uwolnionych cząsteczek znacznika, i tym silniejsza fluorescencja po wzbudzeniu. Wzbudzenie i pomiar fluorescencji można prowadzić podczas reakcji PCR, obserwując narastanie fluorescencji w czasie rzeczywistym. W celu oznaczenia AGCN stosuje się odpowiedni pomiar dla sekwencji badanej i kontrolnej [42]. Technika jest bardzo czuła, umożliwia detekcję amplifikacji *ErbB-2* nawet w DNA krążącym we krwi [42].

Kompetycyjna PCR

W reakcji kompetycyjnej techniki PCR (cPCR, ryc. 2.) [18] rolę standardu ilościowego spełnia odpowiednio skonstruowana syntetyczna matryca, czyli kompetytor (nie zaś endogenna sekwencja odniesienia w obrębie badanego DNA, jak w różnicowej technice PCR opisanej powyżej). Amplifikacji techniką cPCR poddaje się serię prób zawierających taką samą ilość badanego DNA oraz różne ilości (seryjne rozcieńczenia o znanym stężeniu) kompetytora. Jest on tak zaprojektowany, iż obie sekwencje, badana i kontrolna, amplifikowane są w jednej próbce za pomocą tej samej pary primerów i współzawodniczą ze sobą w mieszaninie reakcyjnej o wszystkie jej składniki (stąd nazwa metody). Jeśli spełnione jest podstawowe założenie jednakowej wydajności amplifikacji sekwencji badanej i kontrolnej, wówczas stosunek ilościowy tych sekwencji znajduje odzwierciedlenie w stosunku ilościowym odpowiednich produktów PCR, a ponieważ znamy bezwzględną ilość zastosowanego kompetytora, możemy określić bezwzględną ilość badanej sekwencji w analizowanej próbce. Najważniejsza jest tu możliwość rozróżnienia obu rodzajów produktów amplifikacji. Konstrukcja kompetytora umożliwi najczęściej rozróżnienie produktów amplifikacji sekwencji badanej i kontrolnej, dzięki różnicy wielkości lub za pomocą metody hybrydacji ze specyficznymi, różnymi dla obu fragmentów DNA, sondami molekularnymi. W oznaczaniu amplifikacji genów przeprowadza się najczęściej oddzielnie reakcję cPCR dla genu badanego i dla genu referencyjnego, oznaczając bezwzględną liczbę ich kopii w próbce, następnie oblicza się ich stosunek [43–48].

Kombinacje techniki różnicowej i kompetycyjnej w reakcji PCR zostały opisane jako odmiany:

- ▶ kompetycyjno-różnicowa (ang. *competitive-differential PCR*, cdPCR) [49],
- ▶ różnicowo-kompetycyjna PCR (ang. *differentially competitive PCR*, dcPCR) [50].

Mogą być one szczególnie użyteczne w badaniach małych próbek DNA.

PIŚMIENNICTWO

1. Bielawski KP, Vogt U, Falkiewicz B. *Współczesna Onkologia* 1999; 6: 241-3.
2. Carraway KL, Carothers Carraway CA, Carraway KL. *III J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2: 187-198.

3. Gullick WJ. *Biochem Soc Symp* 1998; 63: 193-8.
4. Vogt U, Bielawski K, Schlotter CM, et al. *Gene* 1998; 223: 375-80.
5. Kolibaba KS, Druker BJ. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: F217-F248.
6. Sawyer C, Hiles I, Page M, Crompton M, Dean C. *Oncogene* 1998; 17: 919-24.
7. Gebhardt F, Zänker KS, Brandt B. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 319-23.
8. Von Hoff DH. *Cancer Treat Res* 1991; 57: 1-11.
9. Hamlin JL. *Drug resistance: DNA sequence amplification*. *Encyclopedia of Cancer*, vol. 1, Academic Press, Inc., 1997; 571-86.
10. Chorąży M. *Nowotwory* 1997; 47: 251-63.
11. Limon J. *Czynniki genetyczne*. [W:] Jassem J (red.). *Rak sutki. Podręcznik dla studentów i lekarzy*. Springer PWN, Warszawa, 1998; 84-97.
12. Bielawski K. *Zastosowanie techniki PCR w badaniach onkogenów ErbB i receptorów hormonalnych steroidowych jako potencjalnych czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku sutki*. Praca doktorska. Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, Gdańsk, 1998.
13. Eckhardt SG, Dai A, Davidson KK, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6674-8.
14. Komatani H, Morita M, Sakaizumi N, et al. *Cancer Res* 1999; 59: 2701-8.
15. Bocian E, Limon J. *Metody badań cytogenetycznych*. [W:] Bal J (red.). *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Springer PWN, Warszawa 1998; 84-101.
16. Limon J, Siedlecki A. *Choroby nowotworowe*. [W:] Bal J (red.). *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Springer PWN, Warszawa 1998; 141-174.
17. Jungerman M. *Post Bioch* 1997; 43: 250-6.
18. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 255-69.
19. Southern EM. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-27.
20. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. *Science* 1987; 235: 177-82.
21. Bal J. *Metody badania kwasów nukleinowych*. [W:] Bal J (red.). *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Springer PWN, Warszawa 1998; 71-83.
22. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1974-82.
23. Madeja Z. *Post Biol Kom* 1997; 24 (Suppl. 8): 87-100.
24. Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, et al. *Am J Pathol* 1997; 151: 761-8.
25. Ooi A, Kobayashi M, Mai M, et al. *Lab Invest* 1998; 78: 345-51.
26. Frye RA, Benz CC, Liu E. *Oncogene* 1989; 4: 1153-7.
27. Friedrichs K, Lohmann D, Hofler H. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993; 64: 209-12.
28. Neubauer A, Neubauer B, He M, et al. *Oncogene* 1992; 7: 1019-25.
29. Underwood MA, Bartlett JM, Cooke TG. *PCR Methods Appl.* 1994; 4: 178-184.
30. Zeillinger R, Schneeberger C, Speiser P, et al. *Biotechniques* 1993; 15: 89-95.
31. Sundfors CH, Collan YUI. *FASEB J* 1997; 11: 897-903.
32. Sundfors C, Collan Y. *Cell Mol Biol* 1995; 41: 671-81.
33. Sundfors C, Collan Y. *Electrophoresis* 1996; 17: 44-8.
34. Kricka LJ. *Clin Chem* 1999; 45: 453-8.
35. Gallego S, Reventos J, Sanchez de Toledo J, et al. *Anticancer Res* 1998; 18: 1211-15.
36. Brandt B, Vogt U, Griwatz C, et al. *Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction*. In: Rolfs A, Weber-Rolfs I, Finckh U, editors. *Methods in DNA amplification*. New York: Plenum Press 1994: 55-64.
37. Brandt B, Vogt U, Harms F, et al. *Gene* 1995; 159: 29-34.
38. Brandt B, Vogt U, Schlotter CM, et al. *Gene* 1995; 159: 35-42.
39. Beckmann A, Vogt U, Huda N, et al. *Clin Chem* 1999; 45: 141-3.
40. Gelmini S, Orlando C, Sestini R, et al. *Clin Chem* 1997; 43: 752-8.
41. Bieche I, Olivi M, Champeme MH, et al. *Int J Cancer* 1998; 78: 661-6.
42. Chiang P-W, Beer DG, Wei W-L, et al. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1381-6.
43. Hruza C, Dobianer K, Beck A, et al. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1593-7.
44. Li BD, Harlow SP, Budnick RM, et al. *Cancer* 1994; 73: 2771-8.
45. Sestini R, Orlando C, Zentilin L, et al. *Clin Chem* 1994; 40: 630-6.
46. Selli C, Amorosi A, Vona G, et al. *J Urol* 1997; 158: 245-7.
47. Orlando C, Sestini R, Zentilin L, et al. *J Biolumin Chemilumin* 1994; 9: 223-8.
48. Orlando C, Sestini R, Vona G, et al. *J Urol* 1996; 156: 2089-93.
49. Roetger A, Brandt B, Barnekow A. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 443-8.
50. Deng G, Yu M, Chen LC, et al. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 40: 271-81.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. med. **Krzysztof Bielawski**
Pracownia Diagnostyki Molekularnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej
w Gdańsku
ul. Kładki 24
80-822 Gdańsk

*Praca wykonana
w ramach projektu
BW UG nr B000-5-0134-9,
finansowanego przez KBN.*