

Nowotworem najczęściej diagnozowanym u kobiet, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych jest rak piersi. Jednym z genów, który wzbudza największe zainteresowanie w prognozowaniu i rokowaniu w tym przypadku jest protoonkogen *c-myc*, który pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego i odgrywa kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego. Ekspresja protoonkogeny *c-myc* jest często zaburzona w przypadku wielu nowotworów, a amplifikacja jego genu stanowi jeden z mechanizmów jego aktywacji. W niniejszej pracy wykorzystano technikę dddPCR (*direct double differential PCR*), opracowaną w 1999 r., która nie była dotąd szerzej stosowana w badaniach naukowych ani w praktyce, a której podstawową zaletą jest prosty i szybki sposób przygotowania próbki, wiarygodny wynik oraz niska cena wykonania badania w porównaniu z innymi technikami biologii molekularnej, takimi jak FISH czy *real-time PCR*. Materiał kliniczny do badań stanowił DNA wyizolowany z nowotworów pochodzących od 138 pacjentek chorych na raka piersi. Charakterystyka kliniczna poszczególnych nowotworów była zróżnicowana pod względem statusu nowotworu, statusu węzłów chłonnych, obecności receptorów estrogenowych i progesteronowych, typu histologicznego nowotworu i jego stopnia zróżnicowania histopatologicznego. W 20 spośród 138 analizowanych próbek (14,5%) stwierdzono amplifikację onkogeny *c-myc*, jednak nie znaleziono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy amplifikacją *c-myc* a innymi cechami klinicznymi. Stwierdzono natomiast odwrotną zależność pomiędzy wartością AGCN (*average gene copy number*) oraz statusem nowotworu.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, protoonkogen, *c-myc*, dddPCR.

## Aberracje onkogeny *c-myc* w populacji chorych na raka piersi określone metodą dddPCR

*c-myc oncogene aberration in breast cancer patients assessed by direct double differential PCR*

Natalia Bednarz<sup>1</sup>, Maria Kuberczyk<sup>1</sup>, Anna Żaczek<sup>2</sup>, Krzysztof Piotr Bielawski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku

<sup>2</sup>Trójmiejska Akademicka Zwierzętarnia Doświadczalna, Centrum Badawczo-Ustługowe Akademii Medycznej w Gdańsku

### Wstęp

Zachorowania na raka piersi stanowią ok. 20% zachorowań na wszystkie nowotwory u kobiet, przy czym w Polsce z powodu tej choroby umiera ok. 5 tys. kobiet, a diagnozowanych jest ok. 12 tys. nowych przypadków rocznie [1]. Etiologia choroby nie jest do końca poznana. Rak piersi należy do nowotworów heterogennych, a ścieżki jego inicjacji i progresji są zróżnicowane [2]. Przekłada się to na trudności w ocenie rokowania. Okazuje się bowiem, że pacjenci, u których określono fenotyp raka jako sprzyjający, mają krótki czas przeżycia (OS – *overall survival*) i czas do wznowy (DFS – *disease free survival*). Do wielu czynników, które zwiększają ryzyko zachorowania i mogą wpłynąć na przebieg choroby, zaliczane są m.in. czynniki genetyczne. Wśród nich szczególną uwagę zwraca gen *c-myc* zlokalizowany w obrębie długiego ramienia chromosomu 8. (8q24). Białko c-Myc jest czynnikiem transkrypcyjnym, będącym jednym z kluczowych regulatorów cyklu komórkowego. Jego rola polega głównie na promocji przejścia komórki z fazy G1 do S [3]. Dodatkowo c-Myc aktywuje transkrypcję genów zaangażowanych w procesy, takie jak wzrost, apoptoza, transformacja, angiogeneza, immortalizacja. Genami docelowymi dla c-Myc są również geny różnicowania i adhezji, dla których jest on represorem [4–6]. Aktywność *c-myc* jest ściśle regulowana na poziomie transkrypcyjnym, posttranskrypcyjnym, translacyjnym i posttranslacyjnym [7]. Wszelkie zaburzenia tej regulacji prowadzą do zaburzenia ekspresji genu. Dotychczas opisano kilka mechanizmów prowadzących do aktywacji onkogeny *c-myc* w ludzkich nowotworach. Należą do nich translokacje genu na chromosomy 2., 14. lub 22., amplifikacje genu, mutacje punktowe w allelach *c-myc* ulegających translokacji oraz zaburzenia dotyczące regulatorów ekspresji *c-myc* [6]. Wykazano również, że zwiększona ekspresja białka c-Myc oraz podwyższona ilość mRNA tego białka jest ściśle skorelowana z występowaniem jego amplifikacji [8]. Wyniki części badań wskazują, że *c-myc* może być markerem prognostycznym w raku piersi, co pozwoliłoby w takich wypadkach wyodrębnić grupę pacjentów z gorszym rokowaniem, dlatego w niniejszej pracy zbadano liczbę kopii onkogeny *c-myc*. Wykorzystano technikę dddPCR [9, 10], która jako metoda łatwa, szybka i wiarygodna może stanowić alternatywę dla żmudnych i drogich badań diagnostycznych z wykorzystaniem innych narzędzi biologii molekularnej.

### Materiał i metody

#### Materiał kliniczny

Materiał kliniczny stanowił DNA wyizolowany przy użyciu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) z 138 guzów nowotworowych pochodzących wyłącznie

Breast cancer is the most frequent tumour diagnosed in women, especially in well-developed countries. One of the genes of the highest interest in its diagnosis and prognosis is protooncogene *c-myc*, which plays a role as a transcriptional factor and a key factor in regulation of the cell cycle. Expression of protooncogene *c-myc* is often impaired in the case of various tumours and its gene amplification is one of its activation mechanisms. In this work we used dddPCR (direct double differential PCR), described in 1999, which has not been applied in research or practice in a broader way before now. The advantages of this technique are: simple and fast sample preparation, reliable results and low cost in comparison to other methods used in molecular biology such as FISH or real-time PCR. Material for investigation was DNA isolated from tumours of 138 patients diagnosed with breast cancer. Clinical characterizations of particular tumours were different regarding tumour status, node status, presence of oestrogen and progesterone receptors, histological type of tumour and its histopathological grading. We found amplification of *c-myc* protooncogene in 20 of 138 samples (14.5%); however, there was no statistically significant correlation between *c-myc* amplification and other clinical features. A reverse correlation between AGCN (average gene copy number) value and tumour status was found.

**Key words:** breast cancer, protooncogene, *c-myc*, dddPCR.

od kobiet. 79 chorych leczonych było w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, natomiast 59 – w Regionalnym Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Pacjentki były leczone w wyżej wymienionych ośrodkach pomiędzy 1998 i 2003 r. Ich wiek zawierał się w przedziale 34–85 lat, średnia wynosiła 57 lat. Charakterystyka ogólna chorych przedstawiona jest w tab. 1.

#### dddPCR

Zastosowano startery o następujących sekwencjach: geny referencyjne – **HBB F:** 5'-GCA CTG ACT CTC TCT GCC TAT TGG-3', **HBB R:** 5'-GAT CCA CGT GCA GCT TGT CAC AG-3', **SOD2 F:** 5'-GAG AAG CTG ACG GCT GCA TCT GTT G-3', **SOD2 R:** 5'-AGC AAT TTG TAA GTG TCC CCG TTC C-3' oraz gen badany **c-MYC F:** 5'-GGA CTA TCC TGC TGC CAA GAG GG-3', **c-MYC R:** 5'-CAT TCT CCT CGG TGT CCG AGG ACC-3' [9]. Reakcję PCR przeprowadzano w objętości 50  $\mu$ l z użyciem odczynników w następujących stężeniach: 1 x stęż. PCR bufor (w tym  $MgCl_2$  o stężeniu 1,5 mM), 200  $\mu$ mol dNTP, 1 jednostka polimerazy HotStart Taq (*Roche*), 20 pmol każdego ze starterów oraz ok. 200 ng matrycy DNA. Reakcja PCR była prowadzona przy zastosowaniu następującego profilu temperaturowego:

- wstępna denaturacja w temp. 95°C przez 15 min,
- 30 cykli: denaturacja w temp. 94°C przez 1 min, hybrydyzacja w temp. 62°C przez 1 min oraz

**Tabela 1.** Charakterystyka kliniczna pacjentów

**Table 1.** Clinical characteristics of breast cancer patients

Cecha		Liczba chorych	%
menopauza	przed	42	30
	po	96	70
status T	T1	49	35,5
	T2	67	48,5
	T3	9	6,5
	T4	11	8
	nieoznaczone	2	1,5
status N	N0	89	65
	N1	36	26
	N2	10	7
	nieoznaczone	3	2
status receptorów	ER (+)	64	46
	ER (-)	74	54
	PgR (+)	67	49
	PgR (-)	71	51
typ nowotworu	r. przewodowe	85	62
	r. zrazikowe	27	19
	inne	21	15
	nieoznaczone	3	2
stopień zróżnicowania histologicznego nowotworu wg skali Blooma i Richardsona	I stopień skali	7	5
	II stopień skali	30	21
	III stopień skali	36	26
	nieoznaczone	65	48

**Tabela 2.** Zestawienie cech klinicznych z wartościami AGCN w próbkach z amplifikacją  
**Table 2.** The set of clinical parameters and AGCN values for samples with *c-myc* amplification

	Wiek (lata)	Status menopauzy	T	N	ER	PgR	Histologia	G	AGCN (średnie)
1	81	po	2	0	+	+	inny	bd	1,785
2	51	przed	1	0	-	-	przewodowy	2	1,69
3	53	po	bd	0	-	-	przewodowy	3	2,12
4	36	przed	1	0	-	-	przewodowy	3	1,605
5	38	przed	1	0	+	+	przewodowy	2	1,56
6	44	przed	2	0	+	-	przewodowy	3	1,635
7	73	po	1	0	+	+	przewodowy	2	1,88
8	61	po	2	0	+	+	przewodowy	3	1,66
9	59	po	2	0	+	+	zrazikowy	bd	1,8
10	37	przed	2	0	-	+	przewodowy	2	1,65
11	58	po	2	0	-	-	przewodowy	bd	1,53
12	70	po	4	2	-	+	inny	2	2,845
13	50	przed	2	1	-	-	przewodowy	2	1,635
14	41	przed	2	1	-	+	przewodowy	2	1,755
15	50	po	1	0	+	+	przewodowy	2	1,64
16	42	przed	1	0	+	+	przewodowy	1	1,56
17	50	po	3	1	+	+	przewodowy	bd	1,89
18	71	po	2	1	-	-	przewodowy	3	1,775
19	55	po	1	0	+	-	przewodowy	2	1,64
20	46	po	1	0	-	-	przewodowy	bd	2,305

bd – brak danych

- elongacja w temp. 72°C przez 1 min 10 s, a następnie
- 1 cykl: denaturacja w temp. 94°C przez 1 min, hybrydyzacja w temp. 62°C przez 1 min oraz
- elongacja końcowa w temp. 72°C przez 8 min.

Wszystkie pomiary wykonane zostały przynajmniej 2-krotnie. Kontrola negatywna nie zawierała DNA.

#### Elektroforeza w żelu agarozowym i analiza densytometryczna

Elektroforeza prowadzona była przez 2,5 godz. w 3% żelu agarozowym, w 1 x stęż. TBE, przy napięciu ok. 5 V na 1 cm odległości pomiędzy elektrodami. Żel wybarwiono następnie w roztworze bromku etydyny o stężeniu 0,5 mg/ml. W celu uwidocznienia prążków zastosowano promieniowanie UV o długości fali 302 nm. Porównanie intensywności prążków wykonano przy pomocy sytemu GelDoc 2000™. Aby określić liczbę kopii genu *c-myc* w danej próbce wyznaczono najpierw hipotetyczną wartość intensywności charakterystyczną dla pojedynczej kopii genu (*c-myc*<sub>single copy gene</sub>) wg wzoru:

$$A_{c-myc \text{ single copy gene}} = (L_{c-myc} - L_{HBB}) / (L_{HBB} - L_{SOD2}) \times (A_{HBB} - A_{SOD2}) + A_{HBB}$$

gdzie L oznaczało długość poszczególnych amplikonów podaną w parach zasad, a A intensywność poszczególnych

prążków podaną w jednostkach względnych. Porównując obserwowaną wartość intensywności fluorescencji dla prążka *c-myc* w danej próbce z wyznaczoną wartością hipotetyczną otrzymano wartość określaną jako AGCN (*average gene copy number*), czyli średnią liczbę kopii badanego genu, obliczaną wg wzoru:

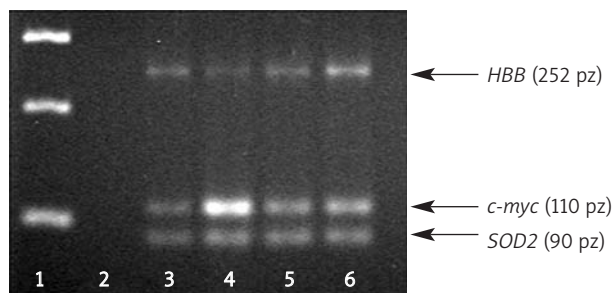
$$AGCN = A_{c-myc} / A_{c-myc \text{ single copy gene}} [9-10]$$

#### Analiza statystyczna

Dane analizowano za pomocą nieparametrycznych testów: testu wariancji Manna-Whitneya i testu niezależności  $\chi^2$ . Dla wartości  $p < 0,05$  wyniki uznano za statystycznie istotne.

#### Wyniki

W celu wyznaczenia, jakie wartości AGCN są statystycznie różne od 1, wykonano 3 razy 8-krotny pomiar dla tej samej próbki zdrowego DNA leukocytarnego. Średnia z uzyskanych w ten sposób odchyleń standardowych wyników wynosiła 0,17. Różnicę krytyczną ( $d_k$ ), która pozwala określić, kiedy wyniki różnią się w sposób istotny statystycznie, wyliczono ze wzoru  $d_k = 2 \times Sd \times \sqrt{2}$ . W przypadku opisywanych badań różnica krytyczna wynosiła 0,5, w związku z czym przyjęto, że *c-myc* występuje w komórkach w pojedynczej kopii, gdy obliczona wartość AGCN zawiera się



**Ryc. 1.** Przykład analizy próbek DNA wyizolowanego z tkanki nowotworowej. 1 – marker długości DNA, 2 – kontrola negatywna (brak matrycy), 3 – DNA leukocytarne (zdrowy), 4 – amplifikacja genu *c-myc*, 5–6 – DNA pacjentek z normalną liczbą kopii genu *c-myc*

**Fig. 1.** Example analysis of DNA isolated from breast cancers: 1 – DNA size marker, 2 – negative control (no template) 3 – DNA from leukocytes of healthy volunteer, 4 – *c-myc* amplification, 5-6 – DNA of patients with normal gene copy number of *c-myc*

w przedziale od 0,5 do 1,5. Wartość AGCN większa od 1,5 oznacza amplifikację, a mniejsza od 0,5 – delecję. Optymalizacja dotyczyła konkretnych warunków, w których prowadzone były badania.

Przykład analizy przedstawiono na ryc. 1.

Amplifikację stwierdzono w 20 spośród 138 analizowanych próbek (14,5%). Wartość AGCN dla próbek, w których stwierdzono amplifikację (AGCN >1,5) zawiera się w przedziale 1,51–2,94. Delecji (AGCN <0,5) nie stwierdzono w żadnym z analizowanych przypadków. Wartość AGCN dla 118 pacjentek zawierała się w przedziale 0,5–1,5, czyli wskazywała na normalną (pojedynczą) liczbę kopii onkogenu *c-myc*. Średnia wartości AGCN dla wszystkich 138 próbek wynosiła 1,21, mediana – 1,17, natomiast dominanta – 1,14. Na podstawie przeprowadzonego nieparametrycznego testu wariancji Manna-Whitneya stwierdzono, że jedynie w odniesieniu do statusu nowotworu istnieje związek z medianą wartości AGCN, która przyjmuje wartości mniejsze, jeżeli średnica guza jest większa ( $p < 0,05$ ). Dla pozostałych parametrów klinicznych (status węzłów chłonnych, status receptorów estrogenowych oraz progesteronowych, typ nowotworu oraz jego stopień zróżnicowania histologicznego) nie stwierdzono istnienia zależności z odpowiadającymi im wartościami AGCN ( $p > 0,05$ ). W celu sprawdzenia, czy istnieje związek pomiędzy występowaniem amplifikacji i innymi cechami klinicznymi nowotworu, wykonano test niezależności  $\chi^2$ . Test ten pozwala na stwierdzenie, czy istnieje zależność pomiędzy cechami jakościowymi dwóch populacji. Istnienia takiej statystycznie istotnej zależności nie stwierdzono. Uwagę zwraca wartość  $p$  dla zależności amplifikacji oraz typu histologicznego nowotworu ( $p = 0,088$ ). Nie jest to zależność istotna statystycznie, ale wskazuje ona pewien trend, polegający na występowaniu amplifikacji częściej w rakach przewodowych. Stosunkowo niewielka wartość może być jednak spowodowana mniejszą liczbą analizowanych przypadków raka zrazikowego.

## Omówienie wyników

Częstość amplifikacji określona w niniejszej pracy przy pomocy techniki dddPCR (14,5%) jest zgodna z dany-

mi literaturowymi, w których częstość amplifikacji wynosi od 1 do 94%, a średnio – 15,5% [11–13]. Dane uzyskane w niniejszej pracy są zbliżone do wyników uzyskanych przy pomocy innych typów PCR przez innych badaczy, gdzie częstość wykrywania amplifikacji przy pomocy dPCR oraz ddPCR wynosiła odpowiednio 21,5% [14] oraz 25% [15]. Szczególnie istotna jest zgodność z wynikami uzyskanymi bardzo czułą i wiarygodną, aczkolwiek kosztowną i czasochłonną metodą FISH, gdzie częstość wykrywania amplifikacji wynosiła 9%, 13% czy 14,6% [16–18].

W celu sprawdzenia, czy istnieje zależność pomiędzy wartością AGCN oraz amplifikacją genu *c-myc* a innymi parametrami klinicznymi, przeprowadzono analizę statystyczną uwzględniającą testy nieparametryczne Manna-Whitneya i  $\chi^2$ . Wśród badanych parametrów klinicznych znalazły się: status nowotworu (wielkość guza), stan węzłów chłonnych, obecność receptorów steroidowych, typ histologiczny nowotworu, stopień dojrzałości histopatologicznej. Stwierdzono istnienie odwrotnej korelacji pomiędzy wartością AGCN oraz statusem nowotworu. Mediana wartości AGCN była wyższa dla nowotworów o mniejszej średnicy. Pewien trend w kierunku istotności statycznej obserwowano także w odniesieniu do zależności pomiędzy amplifikacją genu *c-myc* oraz typem nowotworu. Amplifikacja onkogenu pojawiała się częściej w przypadku raków przewodowych.

W danych literaturowych nie ma zgodności, co do zależności pomiędzy aberracjami onkogenu *c-myc* a innymi cechami klinicznymi, co wynika z faktu, że badania nad rolą onkogenu *c-myc* w kancerogenezie są utrudnione ze względu na złożoność mechanizmów regulacji i działania protoonkogenu *c-myc*. Chrzan i wsp. nie stwierdzili powiązania amplifikacji genu *c-myc* ze średnicą nowotworu, występowaniem lokalnych przerzutów, obecnością receptorów steroidowych oraz dojrzałością histopatologiczną. Zaobserwowali ponadto podobną do uzyskanej w niniejszej pracy częstość amplifikacji w rakach przewodowych i zrazikowych [19]. Podobnie Aulman i wsp. wykluczyli związek pomiędzy amplifikacją genu *c-myc* oraz statusem receptorów estrogenowych i progesteronowych. Natomiast zaobserwowali korelację ze średnicą guza [20]. Z kolei Berns i wsp. znaleźli korelację pomiędzy amplifikacją i zajęciem węzłów chłonnych [21]. Są także badania potwierdzające związek amplifikacji z negatywnym statusem receptora estrogenowego [15] lub progesteronowego [22]. Naidu i wsp. zaobserwowali dodatkowo korelację z wysoką dojrzałością histopatologiczną [15]. Brak jednoznaczności w wynikach przytoczonych badań dotyczących korelacji amplifikacji z innymi cechami klinicznymi wskazuje, że gen *c-myc* może być niezależnym markerem prognostycznym, a także sugeruje konieczność dalszych badań na większej populacji chorych, z uwzględnieniem różnych parametrów klinicznych i molekularnych. W niniejszej pracy niemożliwe było, np. dokonanie weryfikacji wartości prognostycznej amplifikacji onkogenu *c-myc*, tzn. oceny wpływu amplifikacji na czas przeżycia lub ryzyko wznowy. Taka analiza wymaga bowiem wielu lat śledzenia historii choroby pacjentek. Dobrym przykładem tego typu analizy są obserwacje Schlottera i wsp., którzy stwierdzili, że w grupie badanych chorych (brak przerzutów do węzłów chłonnych, brak wspomagającej terapii systemowej), OS i DFS były krótsze, jeżeli dochodziło do amplifikacji genu *c-myc* [14].



Mimo że w badanej populacji chorych na raka piersi nie dowiedziono związku amplifikacji genu *c-myc* z klinicznym obrazem choroby, wykazano, iż dddPCR jest szybkim i tanim testem o potencjale diagnostycznym w wykrywaniu zmiany liczby kopii genów.

*Praca sfinansowana z grantu Uniwersytetu Gdańskiego nr B051-5-0058-6 (KPB) oraz ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej oraz budżetu państwa w związku z realizacją projektu nr Z/2.22/II/2.6/005/05 (NB).*

#### Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Tarkowski W, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2002 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2004.
2. Schmitt FC, Reis-Filho JS. *c-myc*, not *her-2/neu*, can predict the prognosis of breast cancer patients: how novel, how accurate, and how significant? *Breast Cancer Res* 2003; 5: 188-91.
3. Heikkilä R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R, Neckers LM. A *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 1987; 328: 445-9.
4. Dang CV. *c-Myc* target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1-11.
5. Pelengaris S, Khan M. The many faces of *c-MYC*. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416: 129-36.
6. Ponzilli R, Katz S, Barsyte-Lovejoy D, Penn LZ. Cancer therapeutics: targeting the dark side of *Myc*. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2485-501.
7. Levens DL. Reconstructing *MYC*. *Genes Dev* 2003; 17: 1071-7.
8. Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ, Dickson RB. Correlation of amplification and overexpression of the *c-myc* oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* 2004; 90: 1612-9.
9. Beckmann A, Vogt U, Huda N, Zanker KS, Brandt BH. Direct-double-differential PCR for gene dosage quantification of *c-myc*. *Clin Chem* 1999; 5: 141-3.
10. Żaczek A, Welnicka-Jaśkiewicz M, Buerger H, Brandt BH, Bielawski KP. Modified direct-double-differential PCR for gene dosage quantification of *HER2*. *Oncol Rep* 2005; 13: 971-5.
11. Ottestad L, Andersen TI, Nesland JM, Skrede M, Tveit KM, Nustad K, Borresen AL. Amplification of *c-erbB-2*, *int-2* and *c-myc* genes in node-negative breast carcinomas. Relationship to prognosis. *Acta Oncol* 1993; 32: 289-94.
12. Liao DJ, Dickson RB. *c-Myc* in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 143-64.
13. Rao JY, Apple SK, Jin Y, Lin S, Nieberg RK, Hirtschowitz SL. Comparative polymerase chain reaction analysis of *c-myc* amplification on archival breast fine-needle aspiration materials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 175-9.
14. Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, Mersch B, Wassmann K. *c-myc*, not *HER-2/neu*, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 30-6.
15. Naidu R, Wahab NA, Yadav M, Kutty MK. Protein expression and molecular analysis of *c-myc* gene in primary breast carcinomas using immunohistochemistry and differential polymerase chain reaction. *Int J Mol Med* 2002; 9: 189-96.
16. Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Kytola S, Joensuu H, Isola JJ. Amplification of *c-myc* by fluorescence in situ hybridization in a population-based breast cancer tissue array. *Mod Pathol* 2001; 14: 1030-5.
17. Corzo C, Corominas JM, Tusquets I, Salido M, Bellet M, Fabregat X, Serrano S, Sole F. The *MYC* oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 165: 151-6.
18. Robanus-Maandag EC, Bosch CA, Kristel PM, Hart AA, Faneyte IF, Nederlof PM, Peterse JL, van de Vijver MJ. Association of *C-MYC* amplification with progression from the in situ to the invasive stage in *C-MYC*-amplified breast carcinomas. *J Pathol* 2003; 201: 75-82.
19. Chrzan P, Skokowski J, Karmolinski A, Pawelczyk T. Amplification of *c-myc* gene and overexpression of *c-Myc* protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. *Clin Biochem* 2001; 34: 557-62.
20. Aulmann S, Bentz M, Sinn HP. *C-myc* oncogene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74: 25-31.
21. Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA. *c-myc* amplification is a better prognostic factor than *HER2/neu* amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1107-13.
22. Cuny M, Kramar A, Courjal F, et al. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of *p53* mutations. *Cancer Res* 2000; 60: 1077-83.

#### Adres do korespondencji

dr hab. med. **Krzysztof Piotr Bielawski**  
Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG – AMG  
ul. Kładki 24  
80-822 Gdańsk  
tel. +48 58 523 63 14  
faks +48 58 301 28 07  
e-mail: bielawsk@biotech.ug.gda.pl