

Część pierwsza dwuczęściowej pracy poglądowej na temat nowych biomarkerów w raku piersi, odnosi się do znaczników o charakterze prognostycznym i predykcyjnym, stosowanych aktualnie w diagnostyce i leczeniu oraz tych, które znajdują się ciągle w fazie doświadczalnej. Przedstawiono perspektywy stosowania w raku piersi specyficznych biomarkerów cyklu komórkowego, czynników wzrostu i ich receptorów, onkogenów, genów supresorowych. Omówiono próby identyfikacji tych markerów, których wysoka specyficzność i swoistość zapewniłaby możliwość stosowania w identyfikacji pacjentek obciążonych ryzykiem, śledzeniu rozwoju choroby, leczeniu celowanym i rokowaniu. Poruszono również problemy techniczno-formalne stojące na przeszkodzie do ich klinicznego wdrożenia, takie jak trudności standaryzacji procedur, czy brak jednoznacznych kryteriów oceny i interpretacji, jak ma to miejsce w przypadku mikromacierzy.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, biomarker, markery prognostyczne, markery predykcyjne, receptor, czynniki wzrostu, onkogeny.

## Biomarkery w raku piersi

### Część I: receptory, czynniki wzrostu, geny i onkogeny

*Biomarkers in breast cancer*

*Part I: receptors, growth factors, genes and oncogenes*

Tadeusz Ślubowski, Małgorzata Ślubowska

Amberheart Breast Cancer Foundation, Kanada

#### Wstęp

Badania obrazowe, ocena anomalii genetycznych w odniesieniu do predyspozycji rodzinnych oraz ocena proliferacji i atypii komórek w materiale biopsyjnym, stosowane są powszechnie w nowotworach piersi jako wykładniki ryzyka, rozpoznania i rokowania. Pomimo licznych osiągnięć w dziedzinie diagnostyki i terapii raka piersi, takich jak wprowadzenie profilaktyki opartej o przesiewowe badania mammograficzne, czy pooperacyjnej terapii adjuwantowej, badania nad markerami biologicznymi (biomarkerami), nie doprowadziły przez ostatnie 20 lat do osiągnięcia czułości i specyficzności niezbędnej do ich praktycznego i standardowego stosowania w postępowaniu klinicznym. Biomarkery identyfikujące ryzyko zachorowania, niekorzystny przebieg choroby lub złe rokowanie mogą mieć charakter jednoelementowy lub występować jako grupa cech (sygnatury genowe, białkowe etc.) i powinny różnicować populację w odniesieniu do oczekiwanego skutku.

Definicja markera biologicznego jako obiektywnego wyróżnika, używanego do identyfikacji procesu biologicznego, choroby lub oceny reakcji na jej leczenie jest pojęciem bardzo szerokim, dlatego więc stosuje się wiele klasyfikacji biomarkerów. Jedną z nich, używaną także przy diagnostyce i terapii chorych na raka piersi, jest podział na biomarkery prognostyczne i predykcyjne [1].

W ujęciu klasycznym markery prognostyczne służą do identyfikacji pacjentów, u których występuje zróżnicowane, niezależne od leczenia ryzyko, związane ze specyficznym rokowaniem (np. wystąpienie choroby lub zgonu). Przyjmuje się, że w sytuacjach klinicznych, w których nie istnieją żadne opcje lecznicze, marker prognostyczny odnosi się do rokowania bez wdrażania terapii systemowej lub przewiduje, że rozwój choroby jest niezależny od jej stosowania. W przypadku niestosowania terapii adjuwantowej, pacjenci z markerem prognostycznym mają mniejszą szansę na przeżycie, w porównaniu do tych, u których marker nie występuje. Marker prognostyczny nie może być traktowany jako wskaźnik wyboru leczenia, ale może identyfikować pacjentów, dla których istnieje kilka opcji terapeutycznych – łącznie z ewentualnością niestosowania żadnego leczenia [2].

Marker predykcyjny jest specyficznym wyróżnikiem, przepowiadającym uzyskanie remisji w wyniku określonego sposobu leczenia. Pacjenci mający biomarker reagują na leczenie pozytywnie lub lepiej niż ci, u których on nie występuje. Marker predykcyjny może być uznany za wskaźnik do wyboru jednego, najkorzystniejszego z wielu możliwych sposobu leczenia.

Receptor HER2/neu, receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), Cyklina E, białko p53, białko BCL2, endotelialny czynnik wzrostu, urokinazopodobny aktywator plazminogenu, czy ostatnio odkryte białko antyapoptyczne o nazwie survivin, uważane są za biomarkery o wysokim potencjale predykcyjnym.

Niejednokrotnie ten sam marker może być kwalifikowany zarówno jako prognostyczny, jak i predykcyjny. Ma to miejsce, w przypadku receptora HER2/neu, który przez swoją obecność lub poziom ekspresji, wiązany jest ze specyficznym

The first part of this two-part review of established and emerging breast cancer biomarkers considers up-to-date knowledge and describes new types of prognostic and predictive biomarkers, with diagnostic and therapeutic applications in the experimental and clinical milieu. It also discusses new perspectives for utilizing cell cycle markers, growth factors, oncogenes, suppressor genes and cell adhesion markers as prognostic methods in breast cancer development. It outlines efforts for achieving high sensitivity and specificity of biomarkers permitting to detect high risk groups, evaluate the progress of the disease and treatment outcomes. Struggles against formal and technical setbacks hampering the full introduction of biomarkers into the clinic, as takes place in case of microarray techniques, are also described.

**Key words:** breast cancer, biomarker, prognostic marker, predictive marker, receptor, growth factors, oncogenes.

nym przebiegiem procesu złośliwego. Równocześnie jego istnienie lub mnogość miejsc receptorowych ma charakter predykcyjny w kontekście reakcji na leczenie trastuzumabem, dla którego HER2/neu jest receptorem. Podobna sytuacja występuje w przypadku receptorów estrogenowych, które jednak pomimo możliwości podwójnego zaszeregowania, wykazują słabą wartość prognostyczną co do rozwoju nowotworu, a silną wartość predykcyjną do stosowania hormonoterapii. Ostateczne zakwalifikowanie markera do jednej lub drugiej grupy zależy od jego dominującej właściwości.

Przykładowe markery prognostyczne i predykcyjne przedstawiono w tab. 1. [3–5].

### Biomarkery cyklu komórkowego

W raku piersi ocena tempa proliferacji komórek jest istotnym elementem rokowniczym. Oszacowanie liczby figur mitotycznych (MFC), fazy S, indeksu proliferacji Ki67, MIB-1 i antygenu jądrowego komórek proliferujących (PCNA) daje możliwość oceny stopnia złośliwości i postępu choroby. Antygen Ki67, obecny w fazie S, późnej fazie G1 i wczesnej G2/M, oraz antygen PCNA, będące wykładnikami proliferacji są wykrywane immunohistochemicznie przy pomocy przeciwciał monoklonalnych. Ki67 koreluje z innymi wskaźnikami proliferacji, takimi jak wbudowywanie bromodeoksyurydyny, które służą do oceny fazy S. Pomimo tego, że poziom Ki67 jest proporcjonalny do stopnia złośliwości oraz pozytywnej odpowiedzi na chemioterapię, jego znacznie jako indywidualnego czynnika rokowniczego jest ograniczone i jest on rzadko stosowany w rutynowym postępowaniu klinicznym [6].

### Receptory estrogenowe i progesteronowe

W raku sutka ocena receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR) jest jednym z najistotniejszych wskaźników markerowych. Stwierdzenie tych receptorów ma zarówno charakter prognostyczny, ze względu na fakt, że koreluje z niskim wskaźnikiem proliferacji komórek i wyższym poziomem zróżnicowania komórek, jak i predykcyjny – ponieważ guzy wykazujące zarówno ER, jak i PR wykazują większą wrażliwość na terapię hormonalną. Te, które mają ER lub PR występujące samodzielnie, mają także wyższą wrażliwość w porównaniu z nowotworami ER i PR-ujemnymi [7, 8]. Z reguły obecność ER i PR wiązana jest także z brakiem zajęcia węzłów chłonnych, obecnością diploidalnego DNA i tendencją do relatywnie wolnego rozwoju choroby [7–9]. Guzy, w których nie stwierdzono obecności ER/PR- cechują się większą agresywnością, o której świadczą amplifikacja *HER2/neu*, *C-MYC* i onkogenów *INT2*, mutacje genu *p53*, oraz nasilona inwazyjność. Wykazują one także tendencję do tworzenia przerzutów, ocenianą w kryteriach nadmiernej aktywności proteaz, zwiększonej ekspresji czynników wzrostu i ich receptorów [7, 8]. W nowotworach piersi wiele genów przejawia aktywność zależną od stanu receptora estrogenowego [9]. Stwierdzono, że profile aktywności receptorów estrogenowych, oceniane przy pomocy mikromacierzy, wykazują zgodność z ich ekspresją ocenianą za pomocą technik immunocytochemicznych, poziomem m-RNA oraz aktywnością HER2/neu, ocenianą fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ* (FISH) [7, 8]. Uzyskanie informacji na temat stanu funkcjonalnego receptorów ER/PR jest istotne do oceny zasadności stosowania terapii hormonalnej w nowo zdiagnozowanych nowotworach oraz odpowiedzi na nią w stanach zaawansowanych [10]. Początkowo stosowane, ilościowe metody biochemicznej oceny steroidowych białek receptorowych, w ekstraktach z guzów lub cytosolu, wyewoluowały w kierunku ocen immunocytochemicznych na skrawkach [11]. Zdarza się jednak, że wysoki poziom białek ER/PR oznaczanych immunocytochemicznie nie świadczy o ich pełnej aktywności funkcjonalnej, ze względu na mutacje genu kodującego, prowadzące do defektu w wiązaniu estrogenów [12]. Pomimo tego, że oznaczanie ER/PR jest uważane za standard w ocenie reakcji na terapię antyestrogenową tamoksyfenem, w przypadku braku odpowiedzi na leczenie, brane są pod uwagę, jako uzupełniające, inne biomarkery, takie jak HER2/neu

i Katepsyna D [13]. Wprowadzenie do leczenia specyficznych modulatorów odpowiedzi estrogenowej (SERM), jak inhibitory aromatazy – anastrozol, letrozol i eksemestan [14, 15], pozwoliło na rozszerzenie arsenału hormonoterapii, koniecznego w przypadkach, kiedy ER/HER2/neu-pozytywne guzy wykazują oporność na leczenie tamoksyfenem, a reagują na inhibitory aromatazy [16].

## Czynniki wzrostu i ich receptory

### ErbB

W skład grupy receptorów kinazy tyrozynowej wchodzi podgrupa receptorów transbłonowych, zwana ErbB [17]. Zalicza się do niej receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) – określane również jako CerbB1 lub HER1, oraz receptory HER2, 3 i 4.

Receptory ErbB odgrywają rolę zarówno w prawidłowym rozwoju gruczołu sutkowego, jak i w postępie zmian nowotworowych. Ich nadmierna ekspresja wiązana jest ze złym rokowaniem, wysoką złośliwością nowotworu oraz brakiem reakcji na chemioterapię i leczenie hormonalne. Receptor HER1 wykazuje znaczny stopień homologii z białkiem HER2/neu, stanowiącym składową wewnątrzkomórkowej domeny kinazy tyrozynowej, aktywowanej przez ligandy wiążące się do EGFR. EGFR wykazuje nadmierną ekspresję w 14–90% raka piersi (w zależności od metody i rodzaju materiału biologicznego), a jego nadmierna aktywność łączy się ze złym rokowaniem [18].

Próby regulacji i modyfikacji receptora EGFR mogą być dokonywane przez hamowanie działania kinazy tyrozynowej lub blokowanie przy pomocy przeciwciał wiązanych do ligandu. Wiele prac eksperymentalnych podkreśla potencjalne korzyści oddziaływania na EGFR. Szczególnie inhibitory kinazy tyrozynowej wykazują potencjał aktywności do działania pojedynczego, lub w połączeniu z hormonoterapią, chemioterapią lub trastuzumabem [19].

### HER2/neu

Amplifikacja oraz nadekspresja genu i białka HER2/neu została stwierdzona w 10–34% inwazyjnych raków piersi [20]. Z powodu nieznalesienia ligandu dla receptora HER2/neu, uważa się, że jego aktywacja może następować przez homo- lub heterodimeryzację z innymi receptorami tej podgrupy, takimi jak czynnik wzrostu naskórka (EGFR) oraz HER3 i 4. Do określania stanu receptora HER2 w materiale biologicznym, pochodzącym z raka sutka stosuje się techniki morfologiczne lub molekularne. Większość doniesień łączy amplifikację genu i nadmierną produkcję białka HER2/neu ze złym rokowaniem zarówno w przypadkach nowotworów przebiegających z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i bez nich [17, 20].

### TGF

Ekspresja czynnika transformującego wzrost  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), który jest ligandem aktywującym EGFR, jest wiązana ze wznową raka piersi i ze złym rokowaniem [21]. Uważa się, że efekt ten może być związany z aktywacją receptorów dla estrogenów [22]. Jakkolwiek w raku piersi czynnikowi TGF- $\beta$  nie przypisuje się roli markera prognostycznego, to jako

**Tabela 1** Markery prognostyczne i predykcyjne

**Table 1.** Prognostic and predictive markers

Markery prognostyczne	Markery predykcyjne
indeksy wzmożonej proliferacji komórek Ki67 PCNA MIB1	markery receptorów estrogenowych
markery nadmiernej ekspresji onkogenów CerbB2 czynnik transformacji wzrostu (TGF- $\alpha$ ) receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR)	markery receptorów progesteronowych
wskaźniki zaburzeń apoptozy, podwyższona ekspresja <i>BCL2</i> podwyższony współczynnik BAX/BCL2	marker receptora HER2/neu
markery zaburzeń sygnalizacji komórkowej akumulacja białka jądrowego p53 aberracje w przekazie informacji w procesach różnicowania	
nadekspresja <i>C-Myc</i> i związanych z nim białek	
brak receptorów dla markerów różnicowania, czynnika transformującego wzrost TGF- $\beta$ II kwasu retynowego	
zaburzenia białek angiogenezy nadmierna aktywność VEGF	

peptyd regulacyjny związany jest on z procesem wzrostu, stymulacją fibroblastów oraz substancji pozakomórkowej, prowadzącymi do rozrostu podścieliska [23].

### IGF1

Insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-I) oraz jego receptory są uważane za wykładniki proliferacji komórek, a ich aktywność ma związek z długością okresu przeżycia pacjentów [24, 25]. Insulinopodobny czynnik wzrostu oraz związany z nim szlak sygnalizacji jest szeroko dyskutowany w odniesieniu do nowotworów. Receptor dla IGF1 (IGF1R) jest uważany za najistotniejszy element szlaku sygnalizacji białkowej. O ile nie odgrywa on istotnej roli w normalnym wzroście komórek, to pełni ważną rolę zarówno w transformacji nowotworowej, jak i wzroście komórek nowotworowych. Uważa się, że terapia antynowotworowa przy pomocy przeciwciał jednoczących lub związków niskocząsteczkowych oddziałujących selektywnie na IGF1R, ma szansę powodzenia w nowotworach złośliwych, których wzrost zależy od tego receptora [26]. W raku piersi istotne znaczenie przypisuje się także identyfikacji przekazywania sygnału pomiędzy IGF1 oraz receptorem estrogenowym. Według doniesień, IGF1 wzmacnia efekt działania  $17\beta$ -estradiolu na receptor estrogenowy [27].

### PDGF i FGF

W raku piersi płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), wiązany z desmoplastyczną reakcją zrębu komórkowego [28], uważany jest za marker prognostyczny [29]. Wartość prognostyczna czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) nie jest jednoznacznie określona i jej znamienność diagnostyczna oceniana jest zarówno pozytywnie [30, 31], jak i negatywnie [32].

## VEGF

Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF), jest najbardziej aktywnym stymulatorem mitogennym komórek endotelialnych oraz regulatorem przepuszczalności naczyń. Jakkolwiek w raku sutka zidentyfikowano wiele jego receptorów, to ważność roli VEGF w niekorzystnym rokowaniu, podkreślana przez jednych [33–35], jest negowana przez innych autorów [36, 37]. Neoangiogeneza, mierzona ekspresją VEGF jest uważana za bardziej znamiennej w kontekście złego rokowania, niż wskaźnik ilości mikronaczyń przypadających na objętość tkanki nowotworowej w obszarze jej największego wzrostu [38]. Parametrowi temu nie przypisuje się jednak jednoznacznej wartości prognostycznej i predykcyjnej w inwazyjnym raku piersi [39].

Pomimo postępu w dziedzinie badań nad angiogenezą nowotworową, nie istnieje skuteczna terapia antynaczyniowa w leczeniu zaawansowanych postaci raka piersi [40]. Ostatnio wprowadzono na rynek monoklonalne przeciwciała – o nazwie bevacizumab, należące do inhibitorów angiogenezy, stosowane pierwotnie w raku jelita grubego, a rokujące nadzieje również w terapii raka piersi [41].

## Onkogeny

W wyniku mutacji, w procesie zwanym onkogenezą, protoonkogeny, które pełnią rolę w regulacji prawidłowych podziałów komórkowych i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, przekształcają się w onkogeny. Niektórym z nich przypisuje się rolę w dziedzicznych postaciach nowotworów, a także funkcję w mutacjach somatycznych, w których indukowane przez nie białka mogą prowadzić do niekontrolowanej proliferacji i transformacji nowotworowej. W nowotworach piersi istnieje kilka onkogenów i związanych z nimi białek, które traktuje się jako markery.

## BCL2

Zaburzenia mechanizmu apoptozy, fizjologicznie programowanej śmierci komórek, odgrywają istotną rolę w procesie inicjacji i postępie procesu nowotworzenia, jak również w odpowiedzi na leczenie. W wielu nowotworach, towarzyszące procesom apoptozy geny z grupy *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), wykazują zmiany ekspresji, które mogą być interpretowane jako prognostyczny biomarker procesów złośliwych [42].

Grupa onkogenów *BCL2* wydaje się również odgrywać dominującą rolę w kontroli ciągu wydarzeń prowadzących do powstania nowotworu [43]. Od czasu identyfikacji w 1984 r., genu *BCL2*, kodującego białko antyapoptotyczne *BCL2* [44], cała grupa genów, homologiczna do *BCL2*, lecz wykazująca różnorodną rolę regulującą apoptozę, znalazła się w zakresie zainteresowania jako potencjalne markery nowotworowe [45]. Geny te kodują zarówno białka (*BCL2*, *BCLxL*, *BCLw*, *A1*, *Mcl1*) hamujące apoptozę, jak również białka promujące lub przyspieszające apoptozę (*BAX*, *BCLxS*, *BAD*, *BAK*, *BIK/NBK*, *BID*, *BAG1*). W stanie równowagi, względny balans aktywności między czynnikami pro- i antyapoptotycznymi, podlega różnorodnej kontroli – m.in. przez białko p53. Zarówno w normie, jak i w patologii białka te wykazują ukształtowany w okresie embrionalnym i zależny od

stopnia zróżnicowania, specyficzny tkankowo poziom aktywności, indukujący lub hamujący apoptozę. Badania prawidłowych i zmienionych nowotworowo komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego wykazały, że aktywność *BCL2* jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia fizjologicznej wymiany komórek lub przebudowy tkanek w procesie apoptozy. Z ekspresją *BCL2* wiązana jest z możliwością przewidywania skutków terapii hormonalnej i/lub cytotoksycznej. W raku piersi używa się często indeksu, wyrażającego poziom równowagi między ekspresją antyapoptotycznego genu *BCL2* i proapoptotycznego genu *BAX* [46].

## Białka hamowania apoptozy (IAP) – Survivin

W komórkach ssaków apoptoza, poza omówioną powyżej grupą białek *BCL2*, jest regulowana przez drugą istotną grupę protein, zwaną białkami hamowania apoptozy (IAP – *inhibitor-of-apoptosis proteins*). Survivin jest specyficznym białkiem tej grupy, który poza regulacją apoptozy wpływa także na regulację podziałów komórkowych [47]. Jego aktywność związana jest ze strukturami subkomórkowymi, a jego ekspresja regulowana jest przez alternatywne szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Poza rolę w programowanej śmierci komórek, białko to pełni także rolę w regulacji mitozy i stabilizacji mikrotubul. Sądzi się, że nadmierna ekspresja surviviny może być związana z utratą białka p53 [48]. Jakkolwiek uważa się, że w raku piersi jego aktywność ma związek ze złym rokowaniem [49], to dwoistość opinii waha się – od braku jakiegokolwiek zależności [50], do interpretacji nadekspresji jako pozytywnego wskaźnika prognostycznego [51].

Oprócz wspomnianych wyżej, istnieje liczna grupa innych genów, którym przypisuje się rolę w raku sutka. Około 16% źle rokujących nowotworów piersi, wykazuje amplifikację genu *C-Myc* [52, 53]. Stwierdzono, że protoonkogen *C-Myc*, zlokalizowany na chromosomie 8, koduje białko jądrowe stymulujące podziały komórkowe i bierze udział w replikacji, różnicowaniu i apoptozie [54]. Spośród trzech genów *RAS* (*rat-adenosarcoma*) odpowiedzialnych za transdukcję sygnału, gen *HRAS* zlokalizowany na chromosomie 11p15, jest wiązany z progresją raka piersi [55]. W przeciwieństwie do genów tej grupy *KRAS* (chromosom 12p12) i *NRAS* (chromosom 1p13), w których mutacje punktowe są przyczyną nieprawidłowych poziomów białka *RAS* p21, mutacje *HRAS* obserwowane są rzadko, a utrata heterozygotyczności (LOH) częstsza [55, 56].

Stwierdzono, że geny *C-Fos* (chromosom 14q21) i *C-Jun* (chromosom 22q13) odpowiedzialne za aktywację białka AP-1 oraz genu *C-Myb* (chromosom 6q21) wykazują wartość predykcyjną w ocenie nawrotowego raka piersi, reakcji na leczenie hormonalne i okresu przeżycia [57–61].

Przy okazji omawiania markerów genetycznych należy wspomnieć o białku JAB1. Działa ono jako koaktywator współdziałający i wzmacniający transaktywację, prowadząc do proliferacji komórek [62]. Uważa się, że jego rola w proliferacji jest związana z udziałem w przemieszczaniu białka p27 z jądra do cytoplazmy, gdzie ulega ono degradacji przez system ubikwityna/proteasomy [63].

Stwierdzono, że JAB1 wykazuje nadmierną ekspresję w inwazyjnych rakach piersi. W rakach bez zajęcia węzłów chłon-

nych towarzyszy mu niski poziom białka p27. Niezależnie od oznaczanego poziomu, białku JAB1 nie można jednak przypisać roli niezależnego markera prognostycznego [60].

### Geny supresorowe

W przeciwieństwie do onkogenów, geny supresorowe nie są genami dominującymi. Z tego powodu, że mogą ulegać mutacjom w komórkach rozrodczych, wiązane są z dziedzicznymi postaciami nowotworów. Mutacje genów supresorowych przeważnie prowadzą do utraty funkcji, podczas gdy mutacje onkogenów do nadmiernej ekspresji.

#### BRCA1 i BRCA2

Od 5–10% nowotworów piersi wykazuje mutacje genów *BRCA1* lub *BRCA2*, których białka mają cechy supresyjne w stosunku do komórek nowotworowych. Gen *BRCA1*, został zmapowany na chromosomie 17 (17q21) w roku 1990 [64], jako mający związek z dziedzicznym, wcześniej występującym rakiem piersi oraz z dziedzicznym rakiem jajnika [65]. Wkrótce potem odkryto lokalizację drugiego genu *BRCA2* na chromosomie 13 (13q12-q13) [66]. Mutacje *BRCA1* i *BRCA2* odpowiedzialne są za ponad 60% wszystkich dziedzicznych raków piersi. Niestety, istnieje także relatywnie duży procent (10–15%) fałszywie ujemnych wyników badań mutacji *BRCA1* i *BRCA2*, utrudniający proces identyfikacji pacjentów z zależnym od nich wysokim ryzykiem. Należy podkreślić, że negatywny wynik badania genetycznego w kierunku *BRCA* nie wyklucza ryzyka istnienia mutacji tych genów, ani nie świadczy o braku mutacji w obrębie innego genu zwiększającego predyspozycje do zachorowania [67].

#### p53

Gen *p53* jest genem supresorowym zlokalizowanym na chromosomie 17p. Odpowiada on za kodowanie wielofunkcyjnego białka wiążącego DNA, biorącego udział w hamowaniu cyklu komórkowego, procesy reparacyjne DNA, różnicowanie i apoptozę [68]. W ludzkich nowotworach gen ten jest inaktywowany na drodze różnorodnych mechanizmów, takich jak mutacja genu, wiązanie z białkiem wirusowym, czy reakcja z onkoproteiną komórkową MDM2 [69]. Mutację tego genu obserwuje się w ok. 50% ludzkich nowotworów, a także w anomaliach wrodzonych, takich jak zespół Li-Fraumeni [68]. W raku piersi, wskaźnik mutacji *p53* jest niższy niż w innych nowotworach nabłonkowych i łączony jest z bardziej agresywnymi postaciami choroby oraz ze skróceniem czasu przeżycia [70]. Praktyczne wykorzystanie *p53* jako markera prognostycznego jest jednak ograniczone, ze względu na brak jednolitości wyników, uzyskiwanych przy pomocy badań immunohistochemicznych w porównaniu z metodami molekularnymi. Ze względu na wysoki procent fałszywie dodatnich, jak i ujemnych wyników badań immunohistochemicznych, w porównaniu z oceną sekwencji genowych, nie jest możliwe wprowadzenie testów immunocytochemicznych do wiarygodnej identyfikacji mutacji genu *p53* w raku piersi [70–72].

#### MDM2

Gen *MDM2* koduje białko, które wiąże się z genem *p53*, doprowadzając do jego eliminacji jako czynnika hamującego

wzrost nowotworów [73]. W raku piersi amplifikacja *MDM2* jest relatywnie rzadka – ok. 5,7% [74–76]. Nadekspresję *MDM2* wiąże się ze złym rokowaniem zarówno u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i bez nich [74,77].

#### RB

Zaburzenia ekspresji genu supresyjnego – retinoblastomy (*RB*) i odpowiadającego mu białka występują w ok. 10–20% pierwotnych raków piersi [78, 79]. Zmiany struktury tego genu wiązane są przeważnie z małymi guzami, przebiegającymi bez przerzutów do węzłów chłonnych. Marker ten nie wykazuje wartości prognostycznej zarówno co do wznowy, jak i okresu przeżycia [80].

#### NM23

Gen *NM23* zlokalizowany na chromosomie 17q, należy do dużej grupy białek wykazujących aktywność kinazy nukleotydo-dwufosforanowej (NDPK) [81]. Chociaż mechanizm jego działania nie jest jasny uważa się, że gen ten odgrywa rolę w mechanizmie hamowania przerzutów przez przekazywanie sygnału do niezidentyfikowanego receptora. Jakkolwiek utrata ekspresji *NM23* uważana jest przez niektórych autorów za negatywny objaw rokowniczy [82, 83], to jej znaczenie jest negowane przez innych [84].

#### p16 (INK4A)

Cyklinozależne białko inhibitorowe genu supresorowego (*p16 INK4A*) blokuje aktywność kinazy i hamuje wzrost komórek we współdziałaniu z genami *RB*, *p14* i *p15*. Utrata ekspresji genu *p16* może być wynikiem mutacji lub częściej wynikiem hipermetylacji CpGuaniny (CpG) [85, 86]. Wyniki badań nad genem *p16* oraz odpowiadającym mu mRNA i białkiem nie dają jednoznacznej odpowiedzi na temat jego roli w raku piersi, pomimo, że niektóre prace wiążą go ze złym rokowaniem [87–89].

#### PTEN

*PTEN* jest jednym z najczęściej mutujących genów supresyjnych w nowotworach u ludzi. Jego mutacje, mające miejsce w komórkach rozrodczych, są często wiązane z wrodzoną predyspozycją do raka piersi, jak ma to miejsce w zespole Cowdena [90] i wieloogniskowym odpryskowcu (*hamartoma*). Białko supresyjne *PTEN* hamuje funkcję kinazy proteinowej AKT i ogranicza działanie MDM2. Działając promująco na funkcję *p53* powoduje wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię [91]. W raku piersi utrata aktywności *PTEN* wiązana jest z negatywnym rokowaniem [92].

### Podsumowanie

Ocena receptorów estrogenowych i progesteronowych, *BRCA* czy *HER2*, należących do najbardziej powszechnie stosowanych w raku piersi, wywarły znaczący wpływ na ocenę rokowania i wybór leczenia w przypadku konkretnych pacjentów [93].

Jednak, pomimo wysiłków na rzecz identyfikacji innych bardziej funkcjonalnych markerów, użytecznych w raku piersi, wyniki pozostają raczej skromne, ze względu na brak możliwości wyróżnienia pojedynczego genu, białka lub szlaku metabolicznego jako złotego identyfikatora. Z tego powodu

postanowiono skierować wysiłki na bardziej kompleksową ocenę profilu DNA i białek w materiale biologicznym guzów i płynów ustrojowych. Stało się to możliwe dzięki znacznemu postępowi w technikach mikromacierzy DNA, oceniających kompleksowo i jednocześnie ekspresję tysięcy genów w materiale pobranym od konkretnych pacjentów. Jakkolwiek w chwili obecnej nie wiadomo, czy profilowanie to będzie miało charakter uniwersalny, przynoszący korzyść w doborze terapii dla wszystkich pacjentów, to uważa się, że niektórzy z nich mają szansę na odniesienia korzyści z indywidualnie dobranych protokołów leczenia i śledzenia jego efektów. Uważa się również, że jako testy prognostyczne i predykcyjne badania te otworzą drogę do zastąpienia taksonomią molekularną obecnie stosowanych klasyfikacji klinicznych opartych o cechy fenotypowe guzów [94].

#### Piśmiennictwo

- Molina R, Barak V, van Dalen A, et al. Tumor markers in breast cancer – European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol* 2005; 26: 281-93.
- Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette R. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2020-7.
- Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 683-95.
- Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 221-36.
- Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* 2005; 51: 494-503.
- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7212-20.
- Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51: 227-38.
- Locker GY. Hormonal therapy of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 1998; 24: 221-40.
- Pusztai L, Ayers M, Stec J, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2406-15.
- Masood S. Prediction of recurrence for advanced breast cancer. Traditional and contemporary pathologic and molecular markers. *Surg Oncol Clin N Am* 1995; 4: 601-32.
- Wilbur DC, Willis J, Mooney RA, Fallon MA, Moynes R, di Sant'Agnese PA. Estrogen and progesterone detection in archival formalin-fixed paraffin embedded tissue from breast carcinoma: a comparison of immunocytochemistry with dextran coated charcoal assay. *Mod Pathol* 1992; 5: 79-84.
- Lemieux P, Fuqua S. The role of the estrogen receptor in tumor progression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56: 87-91.
- Ciocca DR, Elledge R. Molecular markers for predicting response to tamoxifen in breast cancer patients. *Endocrine* 2000; 13: 1-10.
- Ibrahim NK, Hortobagyi GN. The evolving role of specific estrogen receptor modulators (SERMs). *Surg Oncol* 1999; 8: 103-23.
- Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole and exemestane. *Cancer* 2002; 95: 2006-16.
- Dowsett M, Harper-Wynne C, Boeddinghaus I i wsp. HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8452-58.
- Szaciłowska E, Kozłowski W. Rola receptorów HER i heregulin w powstawaniu przerzutów raka piersi. *Współcz Onkol* 2002; 6: 312-21.
- Nicholson S, Richard J, Sainsbury C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR): results of a six-year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. *Br J Cancer* 1991; 63: 146-50.
- Witters LM, Witkoski A, Planas-Silva MD, Berger M, Viallet J, Lipton A. Synergistic inhibition of breast cancer cell lines with a dual inhibitor of EGFR-HER-2/neu and a Bcl-2 inhibitor. *Oncol Rep* 2007; 17: 465-9.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003; 8: 307-25.
- Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- $\alpha$  predicts worse prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2000; 89: 484-87.
- Yarden RI, Wilson MA, Chrysogelos SA. Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: a possible mechanism to modulate growth. *J Cell Biochem Suppl* 2001; 36: 232-46.
- Dumont N, Arteaga CL. Transforming growth factor- $\beta$  and breast cancer: tumor promoting effects of transforming growth factor- $\beta$ . *Breast Cancer Res* 2000; 2: 125-32.
- Bonnetere J, Peyrat P, Beuscart R, Demaille A. Prognostic significance of insulin-like growth factor I receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 6931-35.
- Oh Y. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47: 283-293.
- Yee D. Targeting insulin-like growth factor pathways. *Br J Cancer* 2006; 94: 465-8.
- Cascio S, Bartella V, Garofalo C, Russo A, Giordano A, Surmacz E. Insulin-like growth factor 1 differentially regulates estrogen receptor-dependent transcription at ERE and AP-1 sites in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 3498-506.
- Shao ZM, Nguyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 2000; 19: 4337-45.
- Rubin BP, Schuetze SM, Eary JF, Norwood TH, Mirza S, Conrad EU, Bruckner JD. Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3586-91.
- Blanckaert VD, Hebbar M, Louchez MM, Vilain MO, Schelling ME, Peyrat JR. Basic fibroblast growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Clin. Cancer Res* 1998; 4: 2939-47.
- Faridi A, Rudlowski C, Biesterfeld S, Schuh S, Rath W, Schroder W. Long-term follow-up and prognostic significance of angiogenic basic fibroblast growth factor (bFGF) expression in patients with breast cancer. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 1-5.
- Smith K, Fox SB, Whitehouse R, Taylor M, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann Oncol* 1999; 10: 707-13.
- Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, Saeki H, Tanaka S, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 66: 159-64.
- Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, Bergh J. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2256-60.
- Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5407-14.
- De Paola F, Granato AM, Scarpi E, Monti F, Medri L, Bianchi S, Amadori D, Volpi A. Vascular endothelial growth factor and prognosis in patients with node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 98: 228-33.
- MacConmara M, O'Hanlon DM, Kiely MJ, Connolly Y, Jeffers M, Keane FB. An evaluation of the prognostic significance of vascular endothelial growth factor in node-positive primary breast carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 717-21.
- Callagy G, Dimitriadis E, Harmey J, Bouchier-Hayes D, Leader M, Kay E. Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer. A more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 8: 104-9.

39. Siitonen SM, Haapasalo HK, Rintala IS i wsp. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod Pathol* 1995; 8: 745-52.
40. Rhee J, Hoff PM. Angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6:1701-11.
41. Schneider BP, Sledge GW Jr. Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4:181-9.
42. Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43: 1-67.
43. Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R. Clinical studies of BCL-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6: 61-8.
44. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097-9.
45. Strasser A, Huang DC, Vaux DL. The role of the BCL-2/ced-9 family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1333: F151-F78.
46. Martinez-Arribas F, Nunez-Villar MJ, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J. Immunofluorometric study of Bcl-2 and Bax expression in clinical fresh tumor samples from breast cancer patients. *Anticancer Res* 2003; 23: 565-8.
47. Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem* 2004; 92: 656-63.
48. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 46-54.
49. Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem* 2004; 50: 1986-93.
50. O'Driscoll L, Linehan R, Kennedy SM, et al. Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax- $\alpha$  and MRP-1 mRNAs in breast cancer. *Cancer Lett* 2003; 201: 225-36.
51. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 1077-83.
52. 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.
53. Ławicki S, Mroczko B, Szmítowski M. Markery nowotworowe raka piersi. *Postępy Hig Med Dośw* 2004; 58: 292-300.
54. Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola JJ. Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence in situ hybridization in archival breast cancer tissue array samples. *Lab Invest* 2001; 81: 1545-51.
55. Rochlitz CF, Scott GK, Dodson JM, Liu E, Dollbaum C, Smith HS, Benz CC. Incidence of activating ras oncogene mutations associated with primary and metastatic human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 357-60.
56. Schondorf T, Andrack A, Niederacher D, Scharl A, Becker M, Engel H, Gohring UJ. H-ras gene amplification or mutation is not common in human primary breast cancer. *Oncol Rep* 1999; 6: 1029-33.
57. Bland KI, Konstadoulakis MM, Vezeridis MP, Wanebo HJ. Oncogene protein coexpression. Value of H-ras, c-myc, c-fos and p53 as prognostic discriminants for breast carcinoma. *Ann Surg* 1995; 221: 706-20.
58. Guerin M, Sheng ZM, Andrieu N i wsp. Strong association between c-myc and estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Oncogene* 1990; 5: 131-5.
59. Gee JM, Ellis IO, Robertson JF, Willsher P, McClelland RA, Hewitt KN, Blamey RW, Nicholson RI. Immunocytochemical localization of Fos protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1995; 64: 269-73.
60. Esteva FJ, Sahin AA, Rassidakis GZ, et al. Jun activation domain binding protein 1 expression is associated with low p27 (Kip1) levels in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5652-59.
61. Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI. Biological and clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. *Int J Cancer* 2000; 89: 177-86.
62. Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 1996; 383: 453-7.
63. Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, et al. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* 2002; 277: 2302-10.
64. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-89.
65. Narod DA, Feunteun J, Lynch HT, Watson P, Conway T, Lynch J, Lenoir GM. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 1991; 338: 82-3.
66. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088-90.
67. Palma M, Ristori E, Ricevuto E, Giannini G, Gulino A. BRCA1 and BRCA2: the genetic testing and the current management options for mutation carriers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 1-23.
68. Liu MC, Gelmann EP. p53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002; 29: 246-57.
69. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3453-9.
70. Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum. Mutat* 2003; 21: 292-300.
71. Muller M, Meyer M, Schilling T, Ulsperger E, Lehnert T, Zentgraf H, Stremmel W, Volkmann M, Galle PR. Testing for anti-p53 antibodies increases the diagnostic sensitivity of conventional tumor markers. *Int J Oncol* 2006; 4: 973-80.
72. Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Beroud C. Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 62-9.
73. Quesnel B, Preudhomme C, Fournier J, Fenaux P, Peyrat JP. MDM2 gene amplification in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30A, 982-4.
74. Al-Kuray K, Schraml P, Torhorst J, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 8534-40.
75. McCann AH, Kirley A, Carney DN, Corbally N, Magee HM, Keating G, Dervan PA. Amplification of the MDM2 gene in human breast cancer and its association with MDMp53 protein status. *Br J Cancer* 1995; 71: 981-5.
76. Bueso-Ramos CE, Manshoury T, Haidar MA, et al. Abnormal expression of MDM-2 in breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37: 179-88.
77. Mathoulin-Portier MP, Viens P, Cowen D, et al. Prognostic value of simultaneous expression of p21 and mdm2 in breast carcinomas treated by adjuvant chemotherapy with anthracycline. *Oncol Rep* 2000; 7: 675-80.
78. Benedict WF, Xu H-J, Takahashi R. The retinoblastoma gene: its role in human malignancies. *Cancer Invest* 1990; 8: 535-40.
79. Varley JM, Armour J, Swallow JE, et al. The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumors. *Oncogene* 1989; 4: 725-29.
80. Berns EM, de Klein A, van Putten WL, van Staveren IL, Bootsma A, Klijn JG, Foekens JA. Association between RB-1 gene alterations and factors of favourable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. *Int J Cancer* 1995; 64: 140-5.
81. Postel EH. NM23-NDP kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1291-95.
82. Mao H, Liu H, Fu X, Fang Z, Abrams J, Worsham MJ. Loss of nm23 expression predicts distal metastases and poorer survival for breast cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 587-91.
83. Terasaki-Fukuzawa Y, Kijima H, Suto A, et al. Decreased nm23 expression but not Ki-67 labeling index, is significantly correlated with lymph node metastasis of breast invasive ductal carcinoma. *Int J Mol Med* 2002; 9: 25-9.
84. Gohring UJ, Eustermann I, Becker M, Neuhaus W, Rein DT, Schondorf T. Lack of prognostic significance of nm23 expression in human primary breast cancer. *Oncol Rep* 2002; 9: 1205-8.

85. Lee MH, Yang HY. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1907-22.
86. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-40.
87. Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JF, Sutherland RL. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2777-87.
88. Han S, Ahn SH, Park K, Bae BN, Kim KH, Kim HJ, Kim YD, Kim HY. P16INK4a protein expression is associated with poor survival of the breast cancer patients after CMF chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 70: 205-12.
89. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Loning T. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 67: 61-70.
90. Petrocelli T, Slingerland JM. PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 356-60.
91. Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 462-67.
92. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001; 14: 672-6.
93. Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1865-78.
94. Lockhart DJ, Winzler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; 405: 827-36.

#### Adres do korespondencji

dr **Tadeusz Ślubowski** MD, PhD  
dr Małgorzata Ślubowska DMD  
Amberheart Breast Cancer Foundation  
#206-2571 Shaughnessy Street  
Canada, V3C 3G3  
tel. 1 604 942 35 69, tel. w Polsce + 48 22 219 57 22  
faks 1 604 942 3087  
e-mail: info@amberheart.net