
Koraljka
GALL-TROŠELJ

GENSKA TEHNOLOGIJA
U OTKRIVANJU
SKLONOSTI ZA RAK

Izučavanje mehanizama koji dovode do nastanka zloćudne preobrazbe stanice nedvojbeno je velik izazov. Iako su na mnoga pitanja koja počinju s “kako...”, odgovori uglavnom poznati, malo je odgovora na pitanja koja počinju sa “zašto...”.

Je li rak nasljedna bolest? Potvrđan odgovor nameće nam brojna pitanja. Na koji način različita istraživanja u području molekularne medicine, poglavito molekularne onkologije, mogu pridonijeti boljem shvaćanju nastanka raka koji je posljedica promjena u određenim genima? Drugim riječima, možemo li, vrlo osjetljivim laboratorijskim metodama, već u ranoj dječjoj dobi odrediti osobe u kojih postoji povećan rizik za dobivanje raka.

Na ta je pitanja najbolje odgovoriti prikazom dvaju gena koji se, ako su mutacijom promijenjeni, smatraju uzročnim čimbenicima nastanka medularnog karcinoma štitnjače i nasljednog karcinoma dojke i/ili jajnika.

Medularni karcinom štitnjače

Medularni karcinom štitnjače (MTC, od engl. *medullary thyroid carcinoma*) čini 3–12% svih zloćudnih tumora štitnjače i definiran je, prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, kao zloćudni tumor nastao od parafolikularnih, C-stanica štitnjače. (1) Pojavljuje se u nasljednom i sporadičnom obliku. U sporadičnim slučajevima (75%) obično se pojavljuje kao solitarni čvor, dok je u nasljednim oblicima, kao dio sindroma multiple endokrine neoplazije tipa 2 (25%), najčešće obostran i nalazi se u više žarišta, a u velikom broju slučajeva postoji i hiperplazija C-stanica u okolnom tkivu. (2,3)

Sindrom multiple endokrine neoplazije tipa 2

Sindrom multiple endokrine neoplazije tipa 2 (MEN 2 od engl. *multiple endocrine neoplasia type 2*) nasljeđuje se auto-

somno dominantno i javlja se u tri različita oblika – sindrom multiple endokrine neoplazije tipa 2A, tipa 2B i FMTC (od engl. *familial medullary thyroid carcinoma*). (4)

Sindrom MEN 2A (Sipplov sindrom) prepoznao je i opisao dr. John Sipple godine 1961. (5) U kliničkoj slici sindroma najčešće je prvi znak bolesti medularni karcinom štitnjače, feokromocitom se javlja u 50%, a hiperparatireoidizam (hiperplazija 84%, adenom paratireoidne žlijezde 16%) u 15–30% slučajeva. (6) Slučajevi bolesti *de novo* javljaju se samo u 5–6% slučajeva.

S obzirom na zahvaćenost pojedinih organa, sindrom MEN 2A podijeljen je u tri skupine. U prvoj su skupini bolesnici u kojih postoji MTC, feokromocitom i hiperparatireoidizam. U drugoj skupini nalaze se oboljeli od MTC-a i feokromocitoma, ali bez bolesti paratireoidne žlijezde. Treću skupinu čine oboljeli od MTC-a s histološki potvrđenom dijagnozom hiperplazije paratireoidnih žlijezda. U tih se osoba ne javlja feokromocitom.

Sindrom MEN 2B opisan je godine 1971. (7) Osim medularnog karcinoma štitnjače i feokromocitoma, u oboljelog postoje različite nepravilnosti u razvoju: marfanoidan izgled i mnogobrojni neuromi sluznice probavnog trakta. Hiperparatireoidizam se u tih bolesnika ne javlja. MTC se u sklopu sindroma MEN 2B javlja ranije nego u sindromu MEN 2A i pokazuje nešto agresivniji tijek bolesti. Rjeđi nalaz jesu zadebljali živci rožnice, difuzna ganglioneuromatoza probavnog trakta i poremećaji u razvoju kosti. Bolest se javlja *de novo* u čak 50% slučajeva.

Sindrom obiteljskog medularnog karcinoma (FMTC od engl. *familial medullary thyroid carcinoma*) obilježava nastanak medularnog karcinoma štitnjače, koji se autosomno dominantno nasljeđuje unutar obitelji. (8) Sadašnji kriterij za postavljanje te dijagnoze jest postojanje najmanje četiri oboljela člana obitelji, bez feokromocitoma i hiperparatireodizma.

Protoonkogen ret

Metodama vezane (*linkage*) analize otkriveno je da se gen, potencijalni kandidat odgovoran za nastanak sindroma MEN 2 nalazi na dugačkom kraku kromosoma 10. Fizičkim mapiranjem tog područja, prvenstveno korištenjem elektroforeze s promjenom smjera električnog polja (engl. *pulsed field electrophoresis*) i pomoću umjetnog kromosoma kvasca (YAC od engl. *yeast artificial chromosome*) pokazano je da se gen nalazi u području 10q11.2 koje je veliko 480

kb. Samo jedan, do tada poznat gen, bio je otkriven u tom području. (9,10)

Godine 1988. Takahashi i suradnici uočili su da nakon ubacivanja DNA iz stanica T-limfoma čovjeka u NIH3T3 stanice miša dolazi do nekontroliranog ispoljavanja jednog gena. Nazvali su ga protoonkogen *ret* (engl. *rearranged during transfection*). Iako o samom genu nisu znali gotovo ništa, na temelju njegove cDNA zaključili su da se radi o transmembranskom receptoru. (11)

Protein kodiran protoonkogenom *ret* receptor je s tirozin kinaznom aktivnošću. Posjeduje veliku izvanstaničnu domenu kodiranu eksonima 1-11 za koju se veže ligand, hidrofobni dio koji prolazi kroz staničnu membranu (transmembranska regija) i citoplazmatski, unutarstanični dio koji posjeduje tirozin kinaznu aktivnost (Slika 1).

Izvanstanična domena građena je od dva odsječka koja imaju visok stupanj sličnosti s kaderinima, molekulama koje sudjeluju u prijenosu signala između stanica. U njoj se nalazi 29 molekula cisteina, koje su vrlo dobro sačuvane tijekom evolucije. Pravilno raspoređene molekule cisteina na kodonima 609, 611, 618, 620, 630, 634 sudjeluju u stvaranju disulfidnih veza kojima se dvije molekule receptora povezuje (dimeriziraju) nakon vezivanja liganda. Tek nakon dimerizacije receptora omogućen je, ligandom posredovan, prijenos signala u stanicu. (12)

Godine 1996. dokazano je da je ligand onkoproteina *ret* neurotropni čimbenik rasta porijeklom iz glija stanica (GDNF, od engl. *glial cell line derived neurotrophic factor*), član obitelji transformirajućih čimbenika rasta β (TGF β od engl. *transforming growth factor β*). (13)

Mutacije protoonkogenog *ret* u sindromu MEN 2

Godine 1993. dvije su skupine istraživača u dva neovisna istraživanja dokazala postojanje točkastih mutacija protoonkogenog *ret* u oboljelih od MEN 2A i FMTC. (14,15) Samo godinu dana poslije dokazano je postojanje nasljedne mutacije u člana obitelji oboljele od MEN 2B.

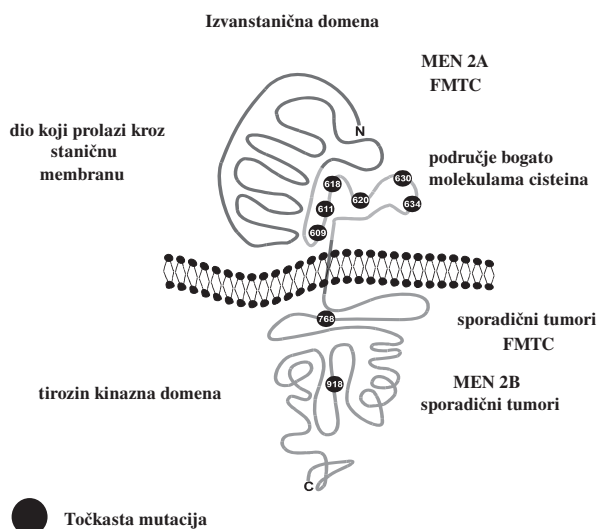
U sindromu MEN 2A najčešće dokazana promjena jest zamjena jedne od molekula cisteina na kodonima 609, 611, 618, 620, 630 i 634 nekom drugom aminokiselinom. Iako vrlo rijetko, moguće je dokazati i male delecije, najčešće u području kodona 634. Točkasta mutacija toga kodona ujedno je i najčešća promjena u sindromu MEN 2A i javlja se u 75% oboljelih. Čak se u 50% slučajeva javlja promjena TGC→CGC, pri čemu je cistein zamijenjen argininom. Istovjetna je mutacija dokazana i u svim, dosad poznatim slučajevima nastanka bolesti *de novo*. Do danas

mutacija protoonkogen *ret* nije pronađena u samo jednoj obitelji sa sindromom MEN 2A.

U sindromu MEN 2B metionin je zamijenjen treoninom na kodonu 918 u 98% obitelji. Ovo je ujedno i najčešća mutacija koja se može dokazati u sporadičnom medularnom karcinomu štitnjače; prema sadašnjim podacima pojavnost joj je između 25 i 80%. Nedavno je pokazano da se u preostalih 2% obitelji nasljedna mutacija protoonkogen *ret* nalazi u eksonu 15, na kodonu 883. (16)

Mutacija protoonkogen *ret* na kodonu 768, koji je kodiran eksonom 13, dovodi do zamjene glutamina asparaginom. Ovo je ujedno i jedina mutacija koja je do danas dokazana u oboljelih od nasljednog medularnog karcinoma štitnjače. (17)

Slika 1.
Shematski prikaz mutacija u onkoproteinu *ret*



Je li za nastanak sindroma MEN 2 uistinu odgovorna promjena u samo jednom genu?

Ako je za nastanak sindroma MEN 2 uistinu odgovorna promjena u samo jednom genu, zašto svi članovi obitelji koji posjeduju istovjetnu mutaciju, ne obole od MTC-a i feokromocitoma u istoj životnoj dobi? Zašto će se u članova obitelji s istovjetnom mutacijom, feokromocitom razviti samo u nekim osoba? I, konačno, zašto su u nekim bolešću zahvaćene paratiroidne žlijezde, a u nekim drugih ne?

Iako je nedvojbeno dokazana uzročno posljedična veza između postojanja mutacije u protoonkogen *ret* i nastanka MTC, autorica teksta smatra da, osim mutiranog (i u zadnje vrijeme vrlo "modernog") protoonkogen *ret*, u

nastanku ovog tumora sudjeluje više nama trenutno nepoznatih gena.

Koga testirati?

Danas je općeprihvaćeno mišljenje da analizu protoonkogeno *ret* treba učiniti u svih osoba oboljelih od MTC-a kako bi se isključilo postojanje nasljedne mutacije. U tom se slučaju zasebno izdvaja DNA iz netumorskog tkiva (najčešće iz stanica pune krvi oboljelog) i tkiva tumora. Odsečci gena, u kojima se nalaze potencijalne mutacije umnožavaju se metodom lančane reakcije polimeraze (PCR od engl. *polymerase chain reaction*), a potom analiziraju metodom određivanja različite duljine restrikcijskih ulomaka (RFLP od engl. *restriction fragment length polymorphism*), odnosno sekvencioniranjem. Ako je mutacija prisutna samo u tkivu tumora, smatramo je somatskom, nenasljednom. Mutacija kodona 918 nalazi se u 20-25% sporadičnih MTC-a.

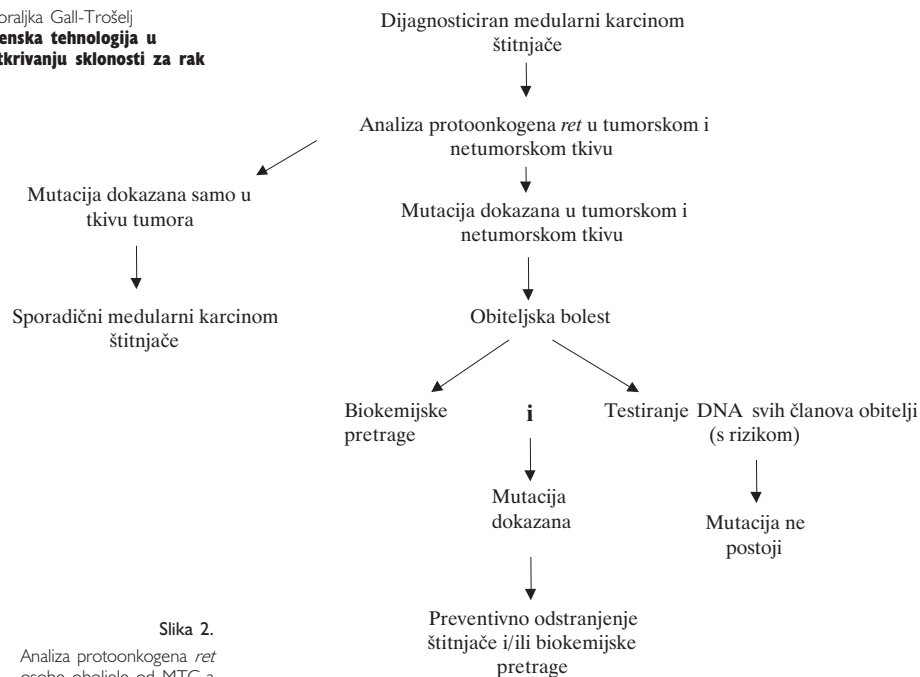
Ako je mutacija prisutna i u netumorskom tkivu, govorimo o nasljednoj (engl. *germline*) mutaciji, koja će se s 50%-tnom vjerojatnošću prenijeti na potomstvo.

Osim dokazivanja prisustva mutacije, neobično je važno isključiti postojanje mutacije u djece oboljelih od te bolesti. Zbog toga analizu treba učiniti što prije, najbolje oko treće godine života. Ako dijete ne posjeduje mutaciju, a vjerojatnost da će se to dogoditi je 50%, rizik od obolijevanja jednak je onom u općoj populaciji, dakle minimalan.

Ako se u djeteta potvrdi prisustvo mutacije koju ima i roditelj, savjetuje se preventivno odstraniti štitnjaču u dobi od pet godina. (18). Naravno, u takvim je slučajevima postupak preventivnog odstranjenja štitnjače **preporuka**, a ne imperativ. Odluku o operativnom zahvatu donose u potpunosti informirani roditelji.

Na Slici 2 prikazan je predloženi algoritam analize protoonkogeno *ret* u osoba koje su oboljele od medularnog karcinoma štitnjače.

Gotovo crno-bijela situacija s kojom se susrećemo pri analizi protoonkogeno *ret*, ne može se primijeniti na istraživanja gena BRCA-1, mutacije kojeg su odgovorne za nastanak nasljednog karcinoma dojke.



Slika 2.
 Analiza protoonkogena *ret*
 osobe oboljele od MTC-a

Nasljedni karcinom dojke

Iako je još godine 1866. francuski kirurg Paul Broca uočio i opisao obiteljsku pojavnost karcinoma dojke, njegov je nastanak znanstveno objašnjen 1994. godine kad je otkriven gen BRCA-1 i promjena u tom genu povezana s nastankom nekih (ne svih) nasljednih karcinoma dojke. (19) U međuvremenu je kloniran i gen nazvan BRCA-2 i smatra se da mutacije u ta dva gena čine genetičku osnovu nastanka 80-90% nasljednih karcinoma dojke. (20)

Nužno je razlikovati nasljedni (HBC, od engl. *hereditary breast cancer*) od obiteljskog karcinoma dojke (FBC, od engl. *familial breast cancer*).

Za **nasljedni karcinom dojke** karakteristično je da se javlja u rođakinja u prvom i drugom koljenu. Rodoslovno stablo upućuje na autosomno dominantno nasljeđivanje vrlo penetrantnoga gena. Najčešće se javlja u ranijoj životnoj dobi, nerijetko obostrano. U nekim se obiteljima, uz karcinom dojke, pojavljuje i karcinom jajnika.

Nasljedni karcinom dojke pojavljuje se u pet različitih sindroma: (21)

1. *Karcinom dojke specifičan za mjesto pojavljivanja* ("site specific"): javlja se u dojci, drugi zloćudni tumori se ne pojavljuju.

2. *Sindrom dojka/jajnik*: pojavnost karcinoma dojke i jajnika u iste osobe i/ili više slučajeva karcinoma dojke i jajnika u istoj obitelji.

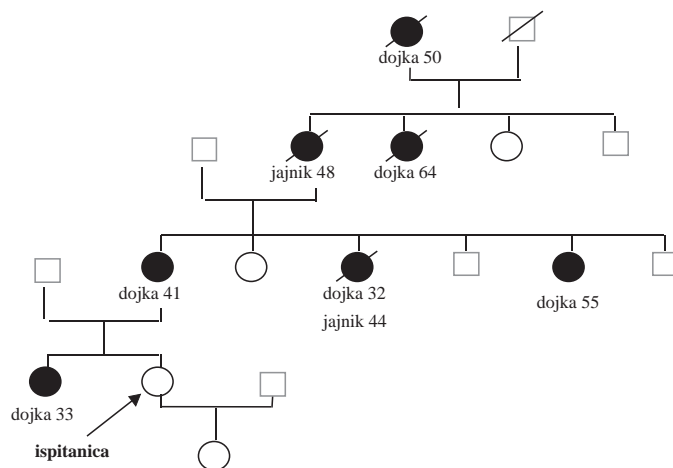
3. *Sindrom Li-Fraumeni*: karcinom dojke udružen s tumorom mozga, sarkomom, leukemijom i tumorima nadbubrežne žlijezde.

4. *Sindrom Cowden*: karcinom dojke udružen s promjenama na koži i sluznici usta i tumorima štitnjače.

5. *Sindrom Peutz-Jegers*: karcinom dojke udružen s karcinom želuca, debelog crijeva i gušterače.

Promjene u genima BRCA-1 i BRCA-2 povezane su s nastankom prva dva sindroma.

Obiteljski karcinom dojke pojavljuje se u rođakinja u prvom i drugom koljenu, ali ne pokazuje osobitosti karakteristične za HBC.



Slika 3.

Gen BRCA-1

Gen BRCA-1 smješten je na dugačkom kraku kromosoma 17 (17q21.1). Sastoji se od 24 eksona, od kojih su 22 kodirajuća. Eksoni 1 i 4 nemaju kodirajuću regiju, dok ekson 11 čini 60% cijeloga gena. Transkript toga gena velik je 7,8 kb i kodira protein veličine 1863 aminokiseline, molekulske mase 220 kD. (19) Divlji tip fosforiliranog oblika proteina nalazi se u jezgri, dok se u stanicama karcinoma dojke mutirani oblik nalazi uglavnom u citoplazmi, što ukazuje da je i funkcija proteina vezana uz jezgru. (22)

Protein BRCA-1 nema sličnosti ni s jednim dosad poznatim proteinom, osim na aminoterminalnom kraju gdje se nalazi područje cinkova prsta (engl. *Zinc-finger*) koje se sastoji od 126 aminokiselina s karakterističnom ra-

spodjelom aminokiselina Cys₃-His-Cys₄. (19) Protein BRCA-1 posjeduje djelomičnu sličnost i s proteinima koji se vežu za molekulu DNA. Ovaj dio molekule proteina izrazito je pozitivno nabijen, za razliku od cijelog proteina koji je negativno nabijen. Protein sadrži najmanje dva signala jezgre kakve imaju ligandi steroidnih ženskih hormona. Oba su kodirana eksonom 11, u kojem se nalazi približno 90% različitih mutacija. (23)

Protein BRCA-1 mogao se dokazati u svim stanicama ispitivanih sisavaca; izrazita aktivnost gena dokazana je u prsnoj žlijezdi, sjemenicima, manje u jajnicima, plućima i jetri. (23)

Pokusima *in vitro* dokazano je da inaktivacija gena izaziva ubranu proliferaciju, odnosno zloćudnu preobrazbu.

Mutacije u genu BRCA-1

U tom genu poznato je oko 300 različitih nasljednih mutacija, najčešće "nonsense" mutacija i mutacija koje izazivaju pomak okvira čitanja (*frame-shift*), od kojih se samo dvije pojavljuju s većom učestalošću i zajedno čine 22% mutacija u tom genu. Čak 85% mutacija dovodi do nastanka skraćenog proteina. Prva mutacija (185delA) nalazi se u eksonu 2 i naročito je česta u populaciji Aškenazi Židova. (24) Prisutna je u 20% oboljelih pripadnica te populacijske skupine. (25) Druga mutacija je mala insercija (5382insC), koja se također pojavljuje u toj populaciji. Preostale se mutacije u literaturi opisuju vrlo rijetko; vrlo često je pojedina mutacija prisutna samo u jednoj obitelji, pa je stoga sekvencioniranje gena metoda izbora u analizi. (24)

Vjerojatnost da će osoba, u čijoj obitelji postoji nasljedni rak jajnika i/ili dojke, naslijediti mutirani tip gena od oboljelog roditelja, i na taj način postati zdravi nositelj jest 50%. Vjerojatnost da ženska osoba, nositelj mutiranog tipa gena i sama oboli od karcinoma dojke do 50. godine života je 50%. Rizik se povećava sa životnom dobi i u 70. godini je 80-90%. (19)

Vjerojatnost postojanja mutacije u genu BRCA-1 s obzirom na starost i obiteljsku anamnezu prikazana je u Tablici 1.

| Oboljeli u obitelji i starost oboljelih u vrijeme postavljanja dijagnoze | Vjerojatnost (%) postojanja mutacije u genu BRCA-1 |
|--|--|
| <i>Jedini oboljeli član u obitelji</i> | |
| karcinom dojke, <30 | 12 |
| karcinom dojke, 30-39 | 6 |
| karcinom dojke, 40-49 | 3 |
| karcinom jajnika, <50 | 7 |
| <i>Sestre</i> | |
| dvije s karcinomom dojke, <40 | 37 |
| dvije s karcinomom dojke, 40-49 | 20 |
| karcinom dojke <50, karcinom jajnika, <50 | 46 |
| dvije s karcinomom jajnika, <50 | 61 |
| <i>Obitelji</i> | |
| tri oboljele od karcinoma dojke, <50 | 40 |
| ≥ dvije oboljele od karcinoma dojke, ≥ jedne oboljele od karcinoma jajnika | 82 |
| ≥ dvije oboljele od karcinoma dojke, ≥ dvije oboljele od karcinoma jajnika | 92 |

Tablica 1.

Vjerojatnost postojanja mutacije u genu BRCA-1 u odnosu na postavljenu dijagnozu, starost i rodbinske veze oboljelih (26)

Kako testirati?

Analizu gena BRCA-1 treba povjeriti iskusnim stručnjacima u dobro opremljenom laboratoriju, no prije uzimanja uzorka krvi za analizu potrebno je s ispitanikom obaviti iscrpan razgovor, tijekom kojeg treba izraditi rodoslovno stablo obitelji. Ako se nakon razgovora postavi indikacija za testiranje, o čemu, kao i u slučaju testiranja zbog MTC-a, odlučuje ispitanik, test je potrebno provesti. Pritom rezultate analize treba predložiti multidisciplinarnoj ekipi stručnjaka, koji određuju rizik od pojavnosti bolesti u nositelja i ne-nositelja promijenjenoga gena. Naročito je važno uočiti mogućnost pogreške koja može biti vezana za korištenu metodologiju. Rezultat bi ispitaniku trebalo priopćiti vrlo oprezno, uz nudišenje svih mogućnosti liječenja i praćenja. Nužno je osigurati trajnu pomoć psihologa.

Od neprocjenjive je važnosti osigurati tajnost dobivenih rezultata, kako bi se izbjegli svi oblici diskriminacije pri zapošljavanju ili dobivanju različitih vrsta zdravstvenih i inih osiguranja osoba u kojih postoji mutacija u analiziranom genu. (27)

Najčešći problemi

Najčešći problemi koji se javljaju pri testiranju vezani su za korištenu metodologiju i materijalne troškove te razumijevanje dobivenih rezultata.

Iako nam na raspolaganju stoje vrlo osjetljive metode, analiza gena BRCA vrlo je skupa i dugotrajna. Smatra se da samo u Velikoj Britaniji postoji približno 100.000 žena između 20. i 49. godine, potencijalnih kandidatkinja za testiranje, kojima su od karcinoma dojke oboljele majka i majčina sestra (*mother-aunt families*). Smatra se da se mutacija gena BRCA-1/BRCA-2 neće naći čak u 80% ovakvih obitelji. Zašto?

Bez obzira na to kojom se metodom/metodama služili za otkrivanje mutacija u tim genima, čak 20% mutacija ostaje neotkriveno, iako su prisutne, za što postoji nekoliko razloga. Iako vrlo uznapredovala, tehnologija kojom se koristimo nije idealna i pogreške su moguće u otprilike 20% slučajeva. Budući da geni BRCA-1/2 nisu i jedini geni mutacije kojih mogu prouzročiti rak dojke/jajnika, nikada se ne smije isključiti postojanje mutacije u nekim nama za sada nepoznatim genima. (28)

Analiza gena, kako bi se otkrila mutacija, zapravo je traženje odstupanja u slijedu nukleotida. Već je rečeno da najveći broj mutacija u genu BRCA-1 dovodi do nastanka skraćenog proteina. Iako su takvi proteini u pravilu nefunkcionalni, poznato je da u zdravoj populaciji postoji oblik proteina BRCA-2 koji je za 92 aminokiseline manji od proteina koji se prvobitno smatrao "normalnim". Drugim riječima, neobično je važno razlučiti pravu mutaciju, dakle onu varijaciju u slijedu nukleotida koja pridonosi povećanom riziku od obolijevanja, od neutralnog polimorfizma. (29)

Čak i u osoba koje imaju istovjetnu mutaciju u genu BRCA-1, rizik od obolijevanja je različit; pojava bolesti ovisi o ustroju genoma jedinke te o djelovanju vanjskih čimbenika. (28) Postoje dvije različite vrste obitelji: a) obitelji u kojima članice s mutacijom imaju 84% šanse da dobiju karcinom ovarija do 70. godine života; b) obitelji u kojima članice imaju 32% šanse da dobiju karcinom do 70. godine života. U drugoj skupini nalaze se osobe koje imaju mutaciju u genu BRCA-1 smještenu u 3' dijelu gena.

Zbog toga je i vrlo teško odgovoriti na pitanje: "Hoću li dobiti i karcinom jajnika? Kad će se to dogoditi?" Na žalost (ili na sreću) na ta pitanja pouzdana odgovora nema. Kao i u mnogim drugim slučajevima, govorimo o većoj ili manjoj vjerojatnosti da se nešto dogodi (ili da se ne dogodi).

Koristi i štete

Analizu ne treba započinjati ako rezultat neće donijeti određenu korist. Ako analizom dokažemo prisustvo mutacije

(i sigurni smo da se ne radi o polimorfizmu), nužno je mijenjati način života ispitanice. Operativni zahvat u smislu preventivnog odstranjenja dojke/jajnika u žena-nositeljica promijenjenoga gena dolazi u obzir samo u krajnjim slučajevima i rasprava o tom problemu prelazi granice ovog teksta. Većina autora smatra da bi redovitim liječničkim pregledima u žena koje imaju mutirani oblik gena BRCA-1 (prva mamografija u dobi od 25 godina) karcinom dojke postao "uhvatljiv", a time i izlječiv u najranijoj fazi. (30)

Koga testirati?

Iako još nema službenih odrednica, preporuka je da se analiza gena BRCA učini u sljedećih osoba: a) u žena kod kojih je postavljena dijagnoza karcinoma dojke prije navršene 30. godine života, b) u žene koja boluje od karcinoma dojke ili jajnika koji je dijagnosticiran prije 50. godine života, a koja ima majku, kćer ili sestru u kojih je karcinom dojke ili jajnika dijagnosticiran prije 50. godine života, c) u oboljele žene u čijoj obitelji najmanje dvije osobe boluje od karcinoma dojke i jedna ili više od karcinoma jajnika, d) u zdrave osobe koja je srodnik oboljele osobe sa znanom mutacijom u genima BRCA-1 ili BRCA-2, e) u žena, pripadnica Aškenazi skupine u kojih je karcinom dojke dijagnosticiran prije 40. godine života, odnosno karcinom jajnika u bilo kojoj životnoj dobi. (28)

1. Hedinger, C., William, E. D., Sobin, L. H. (1988), Histological typing of thyroid tumors, World Health Organization. *International Histological Classification of Tumors*, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag.
2. Ljungberg, O. (1972), On medullary carcinoma of the thyroid, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Suppl. 1231:5-57.
3. Ekblom, M., Valimaki, M. (1987), Familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: Clinical and immunohistochemical findings, *Quart. J. Med.*, 247:899-910.
4. Schimke, R. N. (1984), Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia, *Ann. Rev. Med.*, 35:25-31.
5. Sipple, J. H. (1961), The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland, *Am. J. Med.*, 31:163-166.
6. Mulligan, L. M., Marsh, D. J., Robinson, B. G., Schuffenecker, I., Zedenius, J., Lips, C. J. M., Gagel, R. F., Takai, S.-I., Nol, W. W., Fink, M., Raue, F., Lacroix, A., Thibodeau, S. N., Frilling, A., Ponder, B. A. J., Eng, C. for the International Ret Mutation Consortium. (1995), Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: Report of the International Ret Mutation Consortium. *J. Intern. Med.*, 238:343-346.

LITERATURA

7. Bartlett, R. D., Myall, R. W. T. (1971), A neuroendocrine syndrome: mucosal neuromas, pheochromocytoma and medullary thyroid carcinoma, *Oral. Surg.*, 31:206-220.
8. Farndon, J. R., Leight, G. S., Dilley, W. G., Baylin, S. B., Smallridge, R. C., Harrison, T. S., Wells, S. A. Jr. (1986), Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity, *Br. J. Surg.*, 73:278-81.
9. Lairmore, T. C., Howe, J. R., Korte, J. A., Dilley, W. G., Aine, L., Aine, E., Wells, S. A. Jr., Donis-Keller, H. (1991), Familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2B map to the same region of chromosome 10 as multiple endocrine neoplasia type 2A, *Genomics*, 9:181-92.
10. Mole, S. E., Mulligan, L., Healey, C. S., Ponder, B. A. J., Tunnacliffe, A. (1993), Localization of the gene for multiple endocrine neoplasia type 2A to a 480 kb region in chromosome band 10q11.2, *Hum. Mol. Genet.*, 2:247-252.
11. Takahashi, M., Buma, Y., Iwamoto, T., Inaguma, Y., Ikeda, H., Hiai, H. (1988), Cloning and expression of the *ret* proto-oncogene encoding a receptor tyrosine kinase with two potential transmembrane domains, *Oncogene*, 3:571-78.
12. Mak, Y. F., Ponder, B. A. J. (1996), Ret oncogene, *Curr. Opin. Genet. Devel.*, 6:82-86.
13. Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J. C., Hu, S., Altmock, B., Fox, G. M. (1996), GDNF-induced activation of the *ret* protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-a, a novel receptor for GDNF, *Cell*, 85:1113-1124.
14. Eng, C., Smith, D. P., Mulligan, L. M., Nagai, M. A., Healey, C. S., Ponder, M. A., Gardner, M., Scheumann, G. F. W., Jackson, C. E., Tunacliffe, A., Ponder, B. A. J. (1994), Point mutation within tyrosine kinase domain of the *ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumors, *Hum. Mol. Genet.*, 3:237-41.
15. Donis-Keller, H., Dou, S., Carlson, K. M., Toshima, K., Lairmore, T. C., Howe, J. R., Moley, J. F., Goodfellow, P., Wells, S. A. Jr. (1993), Mutations in the *ret* proto-oncogene is associated with MEN 2A and FMTC, *Hum. Mol. Genet.*, 2:851-56.
16. Gimm, O., Marsh, D. J., Andrew, S. D., Frilling, A., Dahia, P. L. M., Mulligan, L. M., Zajac, J. D., Robinson, B. G., Eng, C. (1997), Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the *ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82:3902-3904.
17. Eng, C., Smith, D. P., Mulligan, L. M. (1995), A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the *ret* protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC, *Oncogene*, 10:509-513.
18. Wells, S. A. Jr., Chi, D. D., Toshima, K., Dehner, L. P., Coffin, C. M., Downton, B., Ivanovich, J. L., DeBenedetti, M. K., Dilley, W. G., Moley, J. F., Norton, J. A., Donis-Keller H. (1994), Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A, *Ann. Surgery*, 220:237-250.
19. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Edisen, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S. et al. (1994), A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science*, 266:66-71.

20. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J. et al. (1995), Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA-2, *Nature*, 378:789-792.
21. Lynch, H. F., Marcus, J. N., Watson, P., Lynch, J. F. (1996), Familial and genetic factors: new evidence, u: Stoll, B. A. (ur.), *Women at high risk to breast cancer*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 27-40.
22. Chen, Y., Chen, C.-F., Riley, D. J., Allred, D. C., Chen, P.-L., Von Hoff, D., Osborne, K., Lee, W.-H. (1995), Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer, *Science*, 270:789-791.
23. Thakur, S., Zhang, H. B., Peng, Y., Le, H., Carrolo, B., Ward, T., Yao, J., Farid, L. M., Couch, F. J., Wilson, R. B., Weber, B. L. (1997), Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal, *Mol. Cell. Biol.*, 17:444-452.
24. Couch, F. J., Weber, B. L. (Breast Cancer Information Core), (1996), Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA-1) gene, *Hum. Mutat.*, 8:8-18.
25. Tonin, P., Serova, O., Lenoir, G., Lynch, H., Durocher, F., Simard, J. et al. (1995), BRCA-1 mutations in Ashkenazi Jewish women, *Am. J. Hum. Genet.*, 57:189.
26. Shattuck-Eidens, D., McClure, M., Simard, J., Labrie, F., Narod, S., Couch, F. et al. (1995), A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA-1 breast and ovarian cancer susceptibility gene: implications for presymptomatic testing and screening, *JAMA*, 273:535-541.
27. Gayther, S. A., Ponder, B. A. J. (1997), Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes and the possibilities for predictive testing, *Mol. Med. Today*, 22:168-174.
28. Green, M. H. (1997), Genetics of breast cancer, *Mayo Clin. Proc.*, 72:54-65
29. Mazoyer, S. (1996), A BRCA 2 polymorphic stop codon resulting in loss of the putative granin domain, *Nat. Genet.*, 14:253-254.