

Barbara Černivc¹, Nikola Bešič², Katarina Lokar³, Mateja Krajc⁴,
Srđan Novaković⁵, Janez Žgajnar⁶

Pogostnost mutacije gena BRCA1 in gena BRCA2 pri moških z rakom dojke v Sloveniji

*Frequency of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations
in Slovenian male breast cancer patients*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: dojka novotvorbe moški – genetika, BRCA1 geni, BRCA2 geni, mutacija

Rak dojke je v Sloveniji najpogostejši rak žensk. Ta rak se pojavlja tudi pri moških, vendar je redek in predstavlja manj kot odstotek raka dojk. Podedovanih rakov dojk je 5–10%. Vzrok za podedovane oblike raka dojk pri nekaterih bolnikih so mutacije genov BRCA1 oziroma BRCA2. Mutacija gena BRCA2 močno poveča tveganje za nastanek raka dojk pri moških, saj naj bi po podatkih iz literature zbolelo kar 15% nosilcev mutacije. Študije raziskovalcev iz različnih držav so pokazale, da je pogostost mutacij genov BRCA2 različna glede na državo. Za slovensko populacijo teh podatkov še nimamo. Namen naše prospektivne populacijske epidemiološke raziskave je ugotoviti, kakšna je pogostnost mutacije gena BRCA2 oziroma BRCA1 pri moških z rakom dojke v Sloveniji. Naša raziskovalna hipoteza je, da je v Sloveniji pogostnost mutacije gena BRCA2 pri bolnikih z rakom dojke več kot 10%. Na Onkološkem inštitutu smo zbrali podatke o 136 moških, ki so zboleli za rakom dojke od leta 1975. Živih je še 38 bolnikov in te smo pisno povabili na genetsko svetovanje in gensko testiranje. Kri so analizirali v Laboratoriju za onkološko genetiko Svobodne univerze v Bruslju. Tam iščejo mutacije genov BRCA1 oziroma BRCA2 s testoma PTT in F-CSGE in sekvencioniranjem vzorcev z nenormalnimi vrhovi. Genetsko testiranje je bilo izvedeno pri 22 moških. Mutacijo gena BRCA2 smo ugotovili pri treh moških. Pri dveh od njih smo našli slovensko founder mutacijo IVS 16-2a>G. To mutacijo so zaenkrat ugotovili pri devetih družinah. Noben bolnik ni imel mutacije gena BRCA1. Mediana starost vseh bolnikov z rakom dojke je bila 58 let (od 17 do 86 let). Mediana starost bolnikov z mutacijo gena BRCA2 je bila 64 let, ostalih bolnikov pa 57 let. Med bolniki z rakom dojke z mutacijo in tistimi brez mutacije nismo ugotovili statistične razlike glede starosti ($p=0,41$). Med bolniki z rakom dojke z mutacijo in tistimi brez mutacije nismo ugotovili statistične razlike glede stadija bolezni ($p=0,21$). Pogostnost mutacije gena BRCA2 pri bolnikih z rakom dojke v Sloveniji je 14%.

ABSTRACT

KEY WORDS: breasts neoplasms male – genetics, genes BRCA1, genes BRCA2, mutation

Breast cancer is the most frequent cancer among women in Slovenia. Male breast cancer, however, is a rare disease comprising less than 1% of breast cancer patients in Slovenia. The causes

¹ Barbara Černivc, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

² Doc. dr. Nikola Bešič, dr. med., Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

³ Katarina Lokar, prof. zdr. vzg., viš. med. ses., Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

⁴ Mag. Mateja Krajc, dr. med., Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

⁵ Viš. znan. sod. Srđan Novaković, univ. dipl. biol., Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

⁶ Doc. dr. Janez Žgajnar, dr. med. Onkološki inštitut v Ljubljani, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

for some of inherited cases are mutations of the BRCA1 or BRCA2 genes. BRCA2 gene mutation carriers have an increased risk of breast cancer. It is estimated that 15% of men who carry a germ-line BRCA2 gene mutation will develop breast cancer. Studies in various countries have shown varying frequencies of BRCA2 gene mutations. There is no information about the frequency of mutation carriers in the Slovene male breast cancer population. The purpose of our population-based study was to determine the frequency of BRCA2 or BRCA1 gene mutation carriers among male breast cancer patients in Slovenia. Our study hypothesis was: The frequency of BRCA2 gene mutation carriers among male breast cancer cases is over 10%. Records on 136 male patients treated for breast cancer between 1975 and 2005 at the Ljubljana Institute of Oncology were retrieved. At the time of our study, 38 of those patients were still alive. They were invited to receive genetic counselling and undergo genetic testing. Genetic testing was performed using blood samples at the Laboratory of Oncological Genetics at the Vrije Universiteit in Brussels. The BRCA1 and BRCA2 genes were screened for mutations using the PTT and F-CSGE tests, then the high peaked samples were sequenced. Twenty-two male breast cancer patients were tested. BRCA2 gene mutation was identified in three male breast cancer patients. Two of them carried the Slovene founder mutation IVS16-2a>G. This mutation has been found in nine Slovene families so far. None of our patients had BRCA1 mutation. The median age of all our patients with breast cancer was 58 years (range 17 to 86 years). The median age of the patients with BRCA2 gene mutation was 64 years and of those without mutation it was 57 years. There was no statistical difference in the ages of the patients with mutation and those without it ($p=0.41$). There was also no statistical difference in the stage of disease in patients with mutation and those without it ($p=0.21$). The frequency of BRCA2 gene mutations among male breast cancer patients in Slovenia is 14%.

UVOD

Rak dojke v Sloveniji je najpogostejši rak žensk. Leta 2001 je v Sloveniji na novo zbolelo 948 žensk (1). Velika večina rakov dojk je sporadičnih, le okoli 5–10% je podedovanih (2–5). Vzrok za nekatere od teh naj bi bila mutacija tumor zavirajočih genov BRCA1 oziroma BRCA2 (2).

Manj kot 1% vseh rakov dojk se pojavi pri moških (5–7). V Sloveniji je leta 2001 za rakom dojke zbolelo deset moških; pojavnost je bila 1/100.000 moških. O večji pojavnosti poročajo raziskovalci iz Južne Kalifornije (2/100.000 moških) (4) in Madžarske (1,8/100.000 moških) (5). Manjšo pojavnost pa so ugotavljali na Švedskem (0,7/100.000 moških) (3) in Poljskem (0,4/100.000 moških) (6).

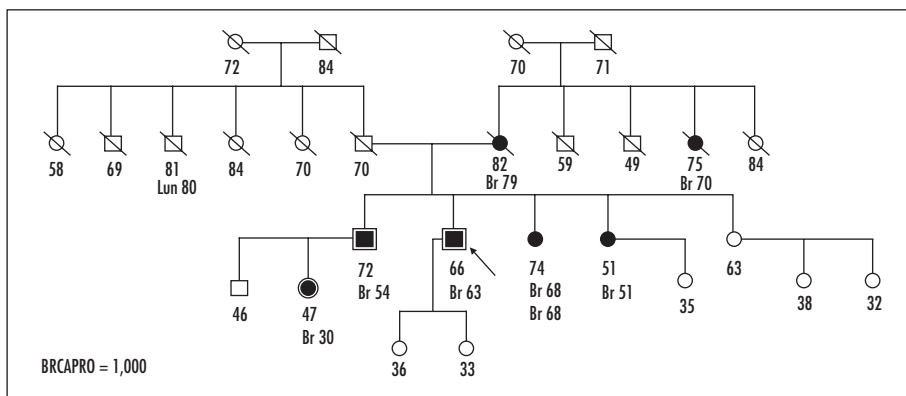
Nekaj avtorjev je našlo mutacijo gena BRCA1 pri moških z rakom dojke (7–9), vendar se pri moških z rakom dojke ta mutacija pojavlja le izjemoma (5).

Tveganje za nastanek raka dojke pri moškem močno poveča mutacija gena BRCA2. Pogostost mutacije gena BRCA2 je v različnih državah različna. Med bolniki z rakom dojke

ima mutacijo gena BRCA2 od 4% (v Južni Kaliforniji) (4) do 40% bolnikov (na Islandiji) (10). Za slovensko populacijo teh podatkov še nimamo.

DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK RAKA DOJK PRI MOŠKIH

Kot pri večini rakavih bolezni tudi pri raku dojke etiologija ni znana. Poznamo pa dejavnike, ki povečajo tveganje za razvoj te oblike raka. Dejavniki tveganja za razvoj raka dojke pri moškem so (3, 6, 11–15): nepravilnosti mod (vnetje mod, operacijska odstranitev mod, poškodba mod, kriporhizem), spremembe dojk (popubertetna ginekomastija, izcedek iz bradavice, ciste na dojkah, poškodba dojke), Klinefelterjev sindrom, rak dojke pri družinskih članih, mutacija gena BRCA2 v družini, (Aškenazi) židovsko poreklo, izpostavljenost ionizirajočemu sevanju, starost, pozna puberteta, povišane vrednosti holesterola v krvi, sladkorna bolezen (dlje kot 11 let), kajenje, debelost, uživanje zdravil (estrogeni, Aldakton, fenotiazini, derivati amfetaminov,



Slika 1. Rodovnik družine s slovensko founder mutacijo gena BRCA2 ter izračun verjetnosti mutacije z BRCAPRO-programom za obolelega sorodnika v prvem kolenu. Legenda: ☒ moški, pokojni; □ moški, živ; ■ obolel moški, živ; ◼ obolel moški, živ, nosilec founder mutacije; ○ ženska, živa; ☒ ženska, pokojna; ● obolela ženska, živa; ◐ obolela ženska, živa, nosilka founder mutacije; ● obolela ženska, pokojna; \ oseba, za katero je izračunana verjetnost z BRCAPRO-programom; Lun = pljučni rak; Br = rak dojke; Br 29 = starost ob diagnozi raka dojke; ☒ trenutna starost; ☒ starost ob smrti.

fenilpropanolamin, amfetamin, dekstroamfetamin).

Več obolelih z rakom dojke kot pri splošni moški populaciji je bilo med vozniki tovornih vozil. Vozniki tovornih vozil naj bi bili bolj izpostavljeni kemikalijam (npr. poliklični aromatski ogljikovodiki), ki lahko povzročijo poškodbo DNK (16). Vozniki tovornih vozil so izpostavljeni tudi nihanjem z visoko frekvenco, ki naj bi povzročale mikrotravme, le-te pa nastanek raka (16).

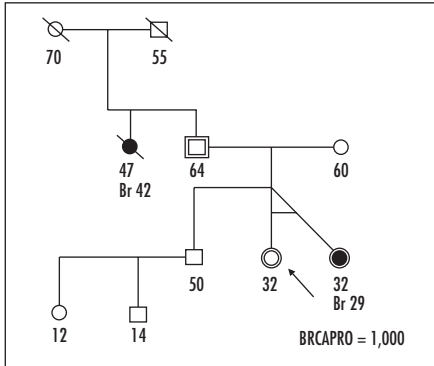
MUTACIJE GENOV BRCA

Raziskovalci so sredi 90. let prejšnjega stoletja pri družinah s pogostim pojavljanjem raka dojk in jajčnikov dokazali gena BRCA1 in BRCA2, ki sta odgovorna za nastanek dednega raka dojke in jajčnikov (2). Oba gena sta pri človeku prisotna v vsaki celici (2). Udeležena sta v popravilu napak molekule DNK ter sodita med tumor zavirajoče gene (2). Gena naj bi bila vključena v nadzor celične delitve ter v vzdrževanje procesa popravila DNK (2). Mutacije genov BRCA same ne vodijo v nastanek rakave bolezni, ampak omogočajo, da se druge genetske napake kopičijo (2). Izguba delovanja zavirajočih genov se lahko pokaže kot tumorska rast (2). Pri nosilcih mutacije genov BRCA1 oziroma BRCA2 je ena kopija gena že okvarjena, zato imajo večjo verjetnost, da zbolijo za rakom dojke (16).

Gen BRCA1 leži na dolgem kraku 17. kromosoma (17). Gen zajema 24 eksonov, ki kodirajo 1863 aminokislinskih dolgih proteinov (17). V splošni populaciji ima patogeno mutacijo gena BRCA1 1/800 oseb (17). Pri genu BRCA1 so opisali preko 600 zarodnih mutacij in sekvenčnih variacij, vendar nobena ni somatska (17). Večina teh mutacij se kaže kot premik bralnega okvirja, ki vodi v nastanek manjkajočih ali nedelujočih genov (17). Problem je prepoznavanje teh mutacij, saj kljub sodobni tehnologiji 30–40% mutacij na genu BRCA1 še ne moremo prepoznati (17). Pri nosilkah mutacije gena BRCA1 je verjetnost nastanka raka dojke 65% do starosti 70 let, za raka jajčnikov pa 39% do iste starosti (18).

Gen BRCA2 leži na dolgem kraku 13. kromosoma (17). Gen zajema 27 eksonov, ki kodirajo 3418 aminokislinskih dolgih proteinov (17). Ta gen je povezan s pogostejšim obolevanjem za rakom dojke, jajčnikov, prostate in trebušne slinavke (17). Pri genu BRCA2 so opisali okoli 450 zarodnih mutacij (17). Posledica delecije, insercije ali nesmiselne mutacije je prezgodnji konec prepisovanja DNA in zato krajši protein (17). Gen BRCA2 ima zelo malo somatskih mutacij (17). Verjetnost nastanka raka dojke pri nosilkah mutacije gena BRCA2 je 45% do starosti 70 let, za raka jajčnikov pa do iste starosti 11% (18).

Moškim, pri katerih se pojavi rak dojke, svetujemo onkološko genetsko svetovanje.



Slika 2. Rodovnik družine s slovensko founder mutacijo gena BRCA2 ter izračun verjetnosti mutacije z BRCAPRO-programom za sorodnico v prvem kolenu (enojajčni dvojčici). Legenda: \square moški, pokojni; \square moški, živ; \square moški, živ, nosilec mutacije; \circ ženska, živa; \circ ženska, živa, nosilka mutacije; \circ ženska, pokojna; \bullet obolela ženska, živa; \bullet obolela ženska, živa, nosilka mutacije; \bullet obolela ženska, pokojna; \backslash oseba, za katero je izračunana verjetnost z BRCAPRO-programom; Br=rak dojke; Br 29=starost ob diagnozi raka dojke; $\frac{32}{32}$ trenutna starost; $\frac{32}{32}$ starost ob smrti; $\frac{32}{32}$ enojajčni dvojčici.

NAMEN IN HIPOTEZA

Študije raziskovalcev iz različnih držav so pokazale, da je pogostost mutacij gena BRCA2 različna glede na državo. Za slovensko populacijo teh podatkov še nimamo.

Namen naše prospektivne populacijske epidemiološke raziskave je ugotoviti, kakšna je pogostost mutacije gena BRCA2 oziroma BRCA1 pri moških z rakom dojke v Sloveniji.

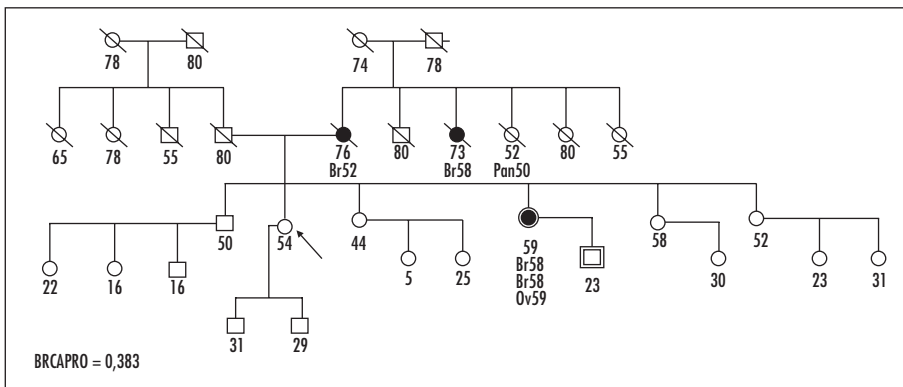
Naša raziskovalna hipoteza je, da je v Sloveniji pogostost mutacije gena BRCA2 pri bolnikih z rakom dojke več kot 10%.

MATERIALI IN METODE

Od leta 1975 do leta 1998 je bilo na Onkološkem inštitutu zdravljenih 136 bolnikov z rakom dojke. Živi jih še 38. Vse te smo povabili na genetsko svetovanje. Pri bolnikih, ki so pristali na genetsko testiranje, smo zbrali podatke o družinski anamnezi glede malignomov, verjetnosti mutacije, izračunane s programom BRCAPRO, starosti bolnikov, stadiju bolezni in prisotnosti mutacije.

Od leta 2001 na Onkološkem inštitutu v Ljubljani izvajajo genetsko svetovanje osebam, pri katerih obstaja sum na dedno obliko raka (19–22). Pri veliki večini oseb je šlo za sum, da gre za dedno obliko raka dojke in jajčnikov (19). Omenjeni vrsti raka predstavljata

Razlog je večja verjetnost dednega raka v družinah, v katerih za to boleznijo zbolijo moški. Namen genetskega svetovanja je ugotoviti, ali gre pri bolniku za dednega raka, ter svetovanje o primernih preventivnih, diagnostičnih ukrepih in ukrepih zdravljenja pri preiskovani osebi in njenih krvnih sorodnikih in sorodnicah.



Slika 3. Rodovnik družine s slovensko founder mutacijo gena BRCA2 ter izračun verjetnosti mutacije z BRCAPRO-programom za sorodnico v prvem kolenu. Legenda: \square moški, pokojni; \square moški, živ; \square moški, živ, nosilec mutacije; \circ ženska, živa; \circ ženska, pokojna; \bullet obolela ženska, živa; \bullet obolela ženska, živa, nosilka mutacije; \bullet obolela ženska, pokojna; \backslash oseba, za katero je izračunana verjetnost z BRCAPRO-programom; Br=rak dojke; Ov=rak jajčnikov; Pan=rak trebušne slinavke; Br 29=starost ob diagnozi raka dojke; $\frac{59}{59}$ trenutna starost; $\frac{59}{59}$ starost ob smrti.

poleg raka širokega črevesa in danke najpogostejšo vrsto dednega raka (19).

Iz podatkov o družinski anamnezi glede malignoma, starosti bolnikov in zdravih članov družine in njihovih sorodstvenih vezi smo z računalniškim programom BRCAPRO izračunali verjetnost mutacije gena BRCA2 pri bolnikih z rakom dojke.

Bolnikom smo odvzeli kri in jo poslali v Laboratorij za onkološko genetiko Svobodne univerze v Bruslju (23). Za analizo mutacij genov BRCA1 oziroma BRCA2 je bila iz levkocitov osamljena genomna DNK (23). Mutacije na genih BRCA1 in BRCA2 iščemo z različnimi presejalnimi testi (23). Na velikih eksonih obeh genov (ekson 11 na BRCA1 in eksona 10 in 11 na genu BRCA2) je bil napravljen PTT-test (Protein Truncation Test) (24), druge manjše eksone obeh genov in konca 5' ter konce 3' večjih eksonov pa smo analizirali s F-CSEGE-testom (Fluorescence based Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) (9, 23). Dobljene PCR-fragmente smo nato analizirali na sekvencionerju (ALF express automatic sequencer - Pharmacia) (23). Vzorci z nenormalnimi vrhovi (mutacija ali polimorfizem) so bili sekvencirani (Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit - USB) (23). Prisotnost slovenske founder mutacije gena BRCA2 smo v Imunološkem laboratoriju Onkološkega inštituta v Ljubljani ugotovili tudi s hitro metodo za ugotavljanje ponavljajoče se mutacije, ki temelji na PCR (23). Uporabili smo poseben prilagojen primer, ki je ustvaril specifično restrikcijsko mesto v divjem tipu fragmenta, ne pa v mutiranem PCR-fragmentu (23).

Raziskava je bila opravljena v skladu z načeli Kodeksa medicinske deontologije in Deklaracije iz Helsinkov/Tokia.

Za statistično analizo starosti bolnikov in rezultatov BRCAPRO-verjetnosti smo uporabili Mann-Whitneyjev test, za analizo stadija bolezni pa Fischerjev natančen test.

REZULTATI

V Sloveniji smo gensko testiranje zaenkrat opravili pri 119 osebah (22 moških in 97 žensk). Do julija 2005 smo odkrili devet različnih mutacij gena BRCA1 in sedem različnih mutacij gena BRCA2. Mutacije gena BRCA1

so našli pri skupno 43 osebah (en moški in 42 žensk). Mutacije gena BRCA2 so našli pri skupno 32 osebah (9 moških in 23 žensk).

V Sloveniji je živih še 38 bolnikov z rakom dojke. Vse smo pisno povabili na genetsko svetovanje. Na naše vabilo se ni odzvalo 12 moških, za enega so svojci klicali, da je prestar, eden pa je odgovoril, da ga genetsko testiranje ne zanima. Na genetsko svetovanje je prišlo 24 bolnikov. Vsem smo ponudili genetsko testiranje. Dva sta testiranje odklonila, dvaindvajsetim smo odvzeli kri in ti so vključeni v našo raziskavo.

Mutacijo gena BRCA2 smo ugotovili pri treh bolnikih. Pogostnost mutacije gena BRCA2 pri bolnikih z rakom dojke v Sloveniji je bila 14% (3/22).

Bolniki z rakom dojke brez mutacije gena BRCA2 so zboleli tudi za drugimi raki: bazaliomom, rakom prostate in dva za rakom ledvic (tabela 1). Vsi ti raki so se pri bolnikih pojavili kasneje kot rak dojke.

Verjetnost mutacije genov BRCA, ki smo jo izračunali z računalniškim programom BRCAPRO, je bila pri bolnikih z mutacijo 0,532–1,000 (mediana 0,585), pri ostalih bolnikih pa 0,016–1,000 (mediana 0,099). V primerjavi z bolniki brez mutacije gena BRCA2 so imeli bolniki z mutacijo večje vrednosti verjetnosti mutacije gena ($p=0,05$).

Mediana starost vseh bolnikov z rakom dojke je bila 58 let (od 17 do 86 let). Mediana starost bolnikov z mutacijo gena BRCA2 je bila 64 let (od 50 do 64 let), ostalih bolnikov pa 57 let (od 17 do 68 let). Med bolniki z rakom dojke z mutacijo in tistimi brez mutacije nismo ugotovili statistične razlike glede starosti ($p=0,41$).

Prvi stadij bolezni je imelo šest bolnikov, drugi stadij devet bolnikov, četrti stadij bolezni pa en bolnik (tabela 1). Med bolniki, ki so imeli mutacijo gena BRCA2, sta imela dva drugi stadij bolezni, tretji bolnik pa je imel četrti stadij bolezni. Glede na stadij bolezni smo bolnike pri statistični analizi razdelili v skupino s I. stadijem bolezni in skupino z II.–IV. stadijem bolezni. Med bolniki z rakom dojke z mutacijo in tistimi brez mutacije nismo ugotovili statistične razlike glede stadija bolezni ($p=0,214$).

Sorodniki naših bolnikov z mutacijo gena BRCA2 so imeli rak dojke, jajčnikov, jeter in

Tabela 1. Starost bolnikov, rezultati genskega testiranja, stadij boleznih ter malignomi pri sorodnikih. MRD=moški z rakom dojke; Ind=indeks (preiskovanec), O=oče, OO=očetov oče, OM=očetova mama, OB=očetov brat, OS=očetova sestra, M=mama, MO=mamin oče, MM=mamina mama, MB=mamin brat, MBH=hči maminega brata, MS=mamina sestra, MS₁, MS₂=mamini sestri, MS₁H₁, MS₁H₂=hčerki mamine sestre, MSH=mamine sestre hči, B=brat, BS=bratov sin, BH=bratova hči, S=sestra, SS=sestrin sin, H=hči, (-)=ni podatkov o starosti ob diagnozi.

Št.	Bolnik	Starost ob diagnozi	Mutacija	TNM	Stadij	Drugi malignomi pri bolnikih z rakom dojke in malignomi v družinski anamnezi
1.	MRD1	64	BRCA2/ IVS16-2a>G	T ₂ N ₁ M ₁	IV	OB: pljuča (-); M: dojka (79); MBH: dojka(-); MS ₁ H ₁ : dojka (-); MS ₁ H ₂ : jajčnik (-); MS ₁ H ₃ : dojka (-); MS ₂ H ₁ : jetra (-); MS: dojke (70); B: dojka (64); S: dojka (61); S: dojka (68,68); H: dojka (30)
2.	MRD2	64	BRCA2/ IVS16-2a>G	T ₁ N _x M ₀	II	OB: pljuča (-); M: dojka (79); MBH: dojka(-); MS ₁ H ₁ : dojka (-); MS ₁ H ₂ : jajčnik (-); MS ₁ H ₃ : dojka (-); MS ₂ H ₁ : jetra (-); MS: dojke (70); B: dojka (64); BH: dojka (30); S: dojka (61); S: dojka (68,68)
3.	MRD3	50	BRCA2/ 4206INS	T ₂ N ₁ M ₀	II	M: jajčnik (40); MO: pljuča (69); MS: dojka (59);
4.	MRD4	42	NEGATIVEN	T ₁ N ₀ M ₀	I	O: pljuča (60); OM: debelo črevo (54); OS: jetra (59); M: maternični vrat (46); MO: prostata (72); MB: želodec (59)
5.	MRD5	42	NEGATIVEN	T ₂ N ₀ M ₀	II	OM: možgani (52)
6.	MRD6	60	NEGATIVEN	ni podatka	ni podatka	O: pljuča (-); M: dojka (-); B: koža (55); B: možgani (66); SS: možgani (44)
7.	MRD7	86	NEGATIVEN	ni podatka	ni podatka	M: pljuča (60)
8.	MRD8	52	NEGATIVEN	ni podatka	ni podatka	M: ne-Hodgkinov limfom (70); MO: grlo (-)
9.	MRD9	17	NEGATIVEN	ni podatka	ni podatka	OB: grlo (55); OS: dojka (62); OS: ginekološki (-); MB: pljuča (-); MB: pljuča (-); MS: debelo črevo (-)
10.	MRD10	62	NEGATIVEN	T ₂ N ₀ M ₀	II	M: levkemija (63)
11.	MRD11	54	NEGATIVEN	ni podatka	ni podatka	Ind: ledvica (57)
12.	MRD12	57	NEGATIVEN	T ₂ N ₀ M _x	II	S: dojka (50)
13.	MRD13	33	NEGATIVEN	T ₁ N ₀ M ₀	I	M: debelo črevo (70)
14.	MRD14	20	NEGATIVEN	T ₁ N ₀ M ₀	I	ni rakov v družini
15.	MRD15	61	NEGATIVEN	T ₁ N ₁ M ₀	II	PB; pljuča (70)
16.	MRD16	57	NEGATIVEN	T ₁ N ₀ M ₀	I	Ind: prostata (67); B: prostata (57)
17.	MRD17	63	NEGATIVEN	T ₁ N ₀ M ₀	I	ni rakov v družini
18.	MRD18	61	NEGATIVEN	T ₁ N ₀ M ₀	I	Ind: bazaliom (70)
19.	MRD19	58	NEGATIVEN	T ₂ N ₁ M ₀	II	Ind: ledvica (57); S: želodec (40)
20.	MRD20	71	NEGATIVEN	T ₁ N ₁ M ₀	II	ni rakov v družini
21.	MRD21	65	NEGATIVEN	T ₂ N ₀ M ₀	II	ni rakov v družini
22.	MRD22	54	NEGATIVEN	ni podatka	ni podatka	OS: ščitnica (-); dojka (57); MS: levkemija (30); S: maternični vrat (38); H: Wilmsov tumor (2)

pljuč. Oba nosilca slovenske founder mutacije izhajata iz iste družine; sta brata. Pri njiju se rak dojke pojavlja pri štirih sorodnicah v prvem kolenu, eni sorodnici v drugem kolenu in treh sorodnicah v tretjem kolenu. Imata tudi sorodnico v drugem kolenu z rakom jajčnikov. V družini je prisoten še rak pljuč in rak jeter. Founder mutacijo ima tudi

obolela hči enega od bratov s founder mutacijo. Drugi njuni sorodniki zaenkrat še niso bili genetsko testirani.

Tretji nosilec mutacije gena BRCA2 (4206insA) ima sorodnico v prvem kolenu z rakom jajčnikov, sorodnico v drugem kolenu z rakom dojke ter sorodnika z rakom pljuč.

Tabela 2. Bolniki z rakom dojke glede na prisotnost mutacije gena BRCA2 in število zbolelih sorodnikov.

	Pri nosilcih mutacije	Brez mutacije	Skupaj
Rak dojke v 1. kolenu	9	2	11
Rak dojke v 2. kolenu	9	2	11
Rak dojke v 1. ali 2. kolenu	18	4	22
Rak jajčnika v 1. kolenu	0	0	0
Rak jajčnika v 2. kolenu	3	0	3
Rak jajčnika v 1. ali 2. kolenu	3	0	3
Rak dojke ali jajčnikov v 1. ali 2. kolenu	22	4	26

Pri sorodnikih bolnikov z rakom dojke brez mutacije gena BRCA2 se pojavlja rak dojke, jeter, pljuč, debelega črevesja, materničnega vratu, prostate, želodca, grla, ščitnice, ne-Hodgkinov limfom, levkemija ter Wilmsov tumor. Dva bolnika imata sorodnico v prvem kolenu z rakom dojke, dva druga bolnika pa imata sorodnico v drugem kolenu z rakom dojke. Pri štirih bolnikih v družinski anamnezi ni raka (tabela 2).

Slovenska founder mutacija je bila odkrita pri devetih družinah. Genetsko testiranje smo opravili pri 38 članih teh družin (tabela 3).

RAZPRAVLJANJE

Pri Slovencih so raziskovalci odkrili, da se v devetih različnih družinah pojavlja founder mutacija IVS16-2 a >G-gena BRCA2 (23). Isto mutacijo so našli tudi v Ameriki pri dveh osebah, ki izvirata iz Evrope, enkrat pa v Italiji pri osebi iz mesta v bližini slovenske meje (23).

Raziskovalci poročajo o razliki v pogostosti mutacij gena BRCA2 pri moških z rakom dojke med različnimi populacijami (tabela 4). V naši raziskavi smo dokazali mutacijo gena BRCA2 pri 14% moških z rakom dojke, kar nas uvršča med države s srednjo stopnjo pogostosti mutacije pri bolnikih z rakom dojke. Na Islandiji so med moškimi z rakom dojke našli mutacijo gena BRCA2 pri 40% bolnikov (10).

Velika stopnja pogostosti mutacije gena BRCA2 pri moških z rakom dojke je razen na Islandiji (10) pogosta še pri Aškenazi Židih (7) in na Madžarskem (5). Vzrok za veliko stopnjo pogostosti mutacije gena BRCA2 na Islandiji in med Aškenazi Židi je pogosta prisotnost founder mutacije v splošni populaciji. Na Islandiji ima founder mutacijo kar 0,4–0,6% populacije (10), med Aškenazi Židi je founder mutacija BRCA2 6174delT prisotna v približno 1% populacije (7, 25). Ta mutacija je lahko vzrok za nastanek raka dojke tako pri moških kot pri ženskah (7). Pri Aškenazi Židinjah in Židih sta vzrok za nastanek raka dojke tudi

Tabela 3. Rezultati genetskega testiranja družin s slovensko founder mutacijo gena BRCA2 in abolevanje za rakom dojk in/ali jajčnikov.

	Moški	Ženske	Skupaj
Slovenska founder mutacija gena BRCA2	6	16	22
• Zdravi nosilci mutacije	4	5	9
• Rak dojke	2	9	11
• Rak obeh dojk	0	1	1
• Rak jajčnikov	–	0	0
• Rak dojke in jajčnikov	–	0	0
Rak obeh dojk in jajčnikov	–	1	1
Osebe brez mutacije gena BRCA2			
Rak dojke ali jajčnikov	3	13	16
	0	0	0
Vsi testirani	9	29	38

Tabela 4. Način presejanja genoma in pogostost mutacije gena BRCA2 pri moških z rakom dojke v različnih populacijah glede na družinsko anamnezo raka dojke.

Populacija (Ref.)	Število bolnikov	Način presejanja	Delež nosilcev mutacije gena BRCA2	
			Vsi bolniki	Bolniki s pozitivno družinsko anamnezo glede raka dojke
Kanada (27)	14	celoten gen	14% (2/14)	29% (2/7)
Francija (28)	12	celoten gen	25% (3/12)	25% (3/12)
Madžarska (5)	18	celoten gen	33% (6/18)	0% (0/4)
Islandija (10)	30	founder	40% (12/30)	90% (9/10)
Izrael (29)	124	founder	12% (15/124)	–
Italija (8)	25	celoten gen	12% (2/25)	29% (2/7)
Poljska (6)	37	celoten gen	11% (4/37)	20% (1/5)
Španija (30)	17	celoten gen	18% (3/17)	33% (3/9)
Švedska (3)	34	celoten gen	21% (7/34)	20% (1/5)
Velika Britanija (31)	28	celoten gen	7% (2/28)	10% (1/10)
Velika Britanija (32)	33	celoten gen	36% (12/33)	40% (12/30)
Velika Britanija (33)	94	celoten gen	5% (5/94)	16% (3/19)
ZDA (4)	54	celoten gen	4% (2/54)	6% (1/16)
ZDA (34)	50	celoten gen	14% (7/50)	15% (6/40)
Finska (15)	154	founder/celoten gen	8% (12/154)	44% (7/16)
Skupno	724		13% (95/724)	
Slovenija (naša študija)	22	founder/celoten gen	14% (3/22)	43% (3/7)

mutaciji gena BRCA1 185delAG in 5382InsC, vsaka od njiju je prisotna v približno 1,2% populacije (25). Zato ne preseneča, da so pri Aškenazi Židinjah našli mutacijo genov BRCA1 ali BRCA2 pri kar 11% naključno izbranih bolnicah z rakom dojke (26).

Na vrednost ugotovljene pogostnosti gena v neki populaciji in na verjetnost, da bomo pri preiskovancu z mutacijo gena BRCA1 ali BRCA2 to tudi našli, zagotovo vplivajo metode za odkrivanje genov, ki so bile uporabljene pri genetskem presejanju. Sedaj je genetsko presejanje velikih genov še vedno tehnično zelo zahtevno (24). Metode, ki jih uporabljajo za odkrivanje mutacij genov BRCA, ter njihova občutljivost se močno razlikujejo (18). Nekateri avtorji so testirali zgolj prisotnost posameznih mutiranih genov (founder mutacije), ki pa predstavljajo le majhne delež mutacij na genih BRCA (18). Ker je nas zanimala prisotnost vseh in ne le določenih mutiranih genov, smo tako kot večina drugih avtorjev (3–7, 23, 33–37) najprej napravili presejalne teste in vzorce z nenormalnimi vrhovi sekvencionirali. V naši študiji smo za presejanje genov uporabili testa PTT in F-CSGE. Znano je, da PTT ne omogoča odkrivanja

drugačnosmiselnih mutacij (3, 4). Te lahko ugotovimo s F-CSGE-testom, ki je hitra in ponovljiva metoda z veliko občutljivostjo (9). Večina metod je najbolj občutljivih za majhne delecije in insercije (18). Znano pa je, da splošno uporabljene metode genske analize dajejo podatke le o kodirajočih sekvencah genov BRCA1 in BRCA2, velike delecije in različice izrezovanja intronov pa lahko preprežejo (21, 38). Petrij-Bosch in sodelavci so dokazali, da je 25% mutacij genov BRCA prisotnih v nekodirajočih regijah obeh genov, za katere so potrebni posebni testi (39).

Zanimivo je, da nobena od sorodnic madžarskih bolnikov z mutacijo gena BRCA2 ni imela raka dojke ali jajčnikov (5). Podobno so tudi Haraldssonova in sodelavci opisali sedem bolnikov z mutacijo gena BRCA2 in zabeležili rak dojke le pri sorodnici enega od teh bolnikov, čeprav so imeli njihovi sorodniki številne druge malignome (3). Odsotnost raka dojke in jajčnikov pri sorodnicah bi lahko razložili s tem, da se je mutacija pojavila v družini pred kratkim, ali pa se je mutacija prenašala preko moških potomcev, pri katerih je verjetnost, da zbolijo za rakom dojke manjša (4). Po mnenju Haraldssonove

in sodelavcev bi odsotnost raka dojke pri sorodnikih le deloma lahko pojasnilo prenašanje gena preko moških, ki niso dobili raka dojke, ter z družinami z majhnim številom sorojencev ali majhnim številom ženskih potomk (3). Verjetneje je, da imajo nekatere mutacije gena BRCA2 manjšo penetranco (3, 5), in/ali na izražanje fenotipa vplivajo preoblikovanje genov in okolje (3). Na spremenljivo penetranco raka dojke pri nosilkah mutirane gena BRCA2 so pomislili že na osnovi izsledkov islandске raziskave (4), v kateri so imeli kar trije od 12 bolnikov z isto mutacijo gena BRCA2 negativno družinsko anamnezo glede raka dojke (10). Možno pa je tudi, da so za dedni rak dojke pri moškem in ženski odgovorni tudi drugi geni, ki jih do sedaj še nismo našli (4, 24).

Kadar se specifična mutacija večkrat pojavlja v različnih družinah, jo imenujemo mutacija founder (23). Odkritje founder mutacije zelo poenostavi in poceni genetsko testiranje, kadar je v populaciji dovolj pogosta (23). BRCA2-mutacija (999delC) je prisotna pri 7–8% naključno izbranih bolnikov z rakom dojke na Islandiji (10), pri ženskah, ki so zbolele pred 40. letom pa kar v 24% (10). Visoka pogostnost mutacij gena BRCA2 na Islandiji lahko razloži za 40% povečano tveganje za nastanek raka dojke pri sorodnici bolnice v prvem kolenu (10). Ocenjeno tveganje za nastanek raka dojke pri nosilcih te mutacije je 37–44% do 70. leta starosti (10). Slovenska founder mutacija je bila opisana leta 2002 in sedaj lahko s PCR-testom, ki je poceni in enostavna metoda, tudi v Sloveniji ugotovljamo prisotnost te mutacije. V Sloveniji smo doslej testirali 38 članov iz devetih družin. Founder mutacijo smo našli pri 22 osebah. 13 nosilcev founder mutacije je zbolelo za rakom ene dojke, ena bolnica za rakom obeh dojk ter ena bolnica z rakom obeh dojk in jajčnikov (tabela 3).

Zaenkrat v Sloveniji še ni znana pogostnost slovenske founder mutacije gena BRCA2 v splošni populaciji, niti v populaciji bolnic in bolnikov z rakom dojke, zato tudi ne more biti znana penetranca tega gena. V Sloveniji smo do sedaj ugotovili slovensko founder mutacijo gena BRCA2 pri devetih moških, dva od njih (= 22%) sta zbolela zaradi raka dojke. Ker je v Sloveniji relativno majhno število

gensko testiranih oseb, ocenjujemo, da je zelo verjetno, da je penetranca gena pri moških manj kot 22%. Vzrok za to oceno je, da zaenkrat v Sloveniji še niso poznane tiste družine, ki imajo slovensko founder mutacijo, v katerih moški nosilci niso zboleli za rakom dojke.

Mutacije genov BRCA1 oziroma BRCA2 so po podatkih iz literature povezane z večjim tveganjem tudi za nastanek nekaterih drugih rakov (2). Mutacija gena BRCA1 poveča tveganje za nastanek raka debelega črevesa, mutacija gena BRCA2 pa je povezana z večjim tveganjem za nastanek raka prostate, povečuje tudi za tveganje za nastanek raka trebušne slinavke, želodca in ustne votline (2). Couch je pri sorodnikih moških z rakom dojke, ki so nosilci mutacije gena BRCA2, opisal tudi rak dojke, rak jajčnikov in rak prostate (34). Eden od njegovih bolnikov ima v anamnezi več primarnih rakov: pri 42 letih je zbolel za rakom danke, pri 46 letih za rakom dojke in pri 47 letih za rakom požiralnika (34). Zaenkrat nimamo podatkov, da bi to veljalo tudi za slovensko founder mutacijo. Nobeden od 22 nosilcev slovenske mutacije BRCA2 gena razen raka dojke in/ali jajčnika ni imel drugega malignoma.

Pri moških z rakom dojke, ki mutacije gena BRCA2 nimajo, pa so našli v družini maligni melanom, rak prostate, rak debelega črevesa in danke, nemelanomski rak kože ter rak maternice (3). Pri krvnih sorodnikih in sorodnicah naših bolnikov z rakom dojke, ki mutacije nimajo, se pojavlja rak jeter, pljuč, debelega črevesja, materničnega vratu, prostate, želodca, grla, ščitnice, ne-Hodgkinov limfom, levkemija ter Wilmsov tumor. Haraldssonova je opisala, da 29% (7/24) bolnikov z rakom dojke, ki nimajo mutacije gena BRCA2, nima raka v družinski anamnezi (3). V Sloveniji je takih družin še manj, saj samo 18% (4/22) naših bolnikov z rakom dojke, ki niso imeli mutacije gena BRCA2, ni imelo malignoma v družinski anamnezi.

Mediana starost naših bolnikov z rakom dojke je bila 58 let, kar je primerljivo s podatki iz literature, kjer navajajo mediano starost od 60 do 69 let (3–7, 15, 33). V literaturi najdemo podatke o tem, da so bolniki z mutacijo gena BRCA2 zboleli mlajši – v starosti od 42 do 91 let (mediana 50 do 65 let) kot tisti bolniki, ki mutacije niso imeli (3–7, 15, 33).

Naši rezultati se s temi podatki ne skladajo, saj se starost obeh skupin bolnikov ni statistično razlikovala. Mediana starost ob diagnozi raka dojke pri naših bolnikih z mutacijo je bila 64 let (od 50 do 64 let), mediana starost ostalih bolnikov z rakom dojke pa je 57 let (od 17 do 68 let).

Tako kot v študiji Haraldssonove in sodelavcev (3) in študiji Kwiatkowske in sodelavcev (6) tudi v naši študiji nismo dokazali, da bi imeli bolniki z mutacijo gena BRCA2 bolj napredovalo bolezen kot bolniki brez mutiranega gena. Haraldssonova in sodelavci poročajo, da je bilo na Švedskem med bolniki z mutacijo 13 % bolnikov v I. stadiju bolezni in 87 % bolnikov v stadiju II–IV (3). Med ostalimi bolniki je bilo 28 % bolnikov v I. stadiju bolezni in 72 % bolnikov v stadiju II–IV (3). Med našimi tremi bolniki z mutacijo gena BRCA2 sta imela dva stadij bolezni II, tretji bolnik pa je imel stadij bolezni IV. Med ostalimi našimi bolniki z rakom dojke je bilo 37 % bolnikov v I. stadiju in 63 % bolnikov v stadiju II–IV. Večja starost ob diagnozi pri naših bolnikih z mutacijo gena kot pri švedskih bolnikih bi lahko pojasnila večji delež bolj napredovale bolezni pri naših bolnikih v primerjavi s švedskimi bolniki.

LITERATURA

1. Primic - Žakelj M, ed. Incidenca raka v Sloveniji 2001: poročilo RR št. 43. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2004.
2. Žgajnar J. Učinkovito genetsko svetovanje: genetski rak dojk in jajčnikov. Delo (Ljubljana), 11. marca 2002; 44 (57): 10–1.
3. Haraldsson K, Loman N, Zhang Q, et al. BRCA2 germ-like mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. *Cancer research* 1998; 58 (7): 1367–71.
4. Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T, et al. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet* 1997; 60 (2): 313–9.
5. Csokay B, Udvarhelyi N, Sulyok Z, et al. High frequency of germ-line BRCA2 mutations among Hungarian male breast cancer patients without family history. *Cancer Research* 1999; 59 (5): 995–8.
6. Kwiatkowska E, Teresiak M, Lamperska KM, et al. BRCA2 germline mutations in male breast cancer patients in the Polish population. *Hum Mutat.* 2001; 17 (1): 73.
7. Sverdlov RS, Barshack I, Bar Sade RB, et al. Genetic analyses of male breast cancer in Israel. *Genetic testing* 2000; 4 (3): 313–7.
8. Ottini L, Masala G, D'Amico C, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation status and tumour characteristics in male breast cancer: a population-based study in Italy. *Cancer Res* 2003; 63 (2): 342–7.
9. Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M, et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 1995; 10 (2): 208–12.
10. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, et al. A single BRCA2 mutation in female and male breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 1996; 13 (1): 117–9.
11. Sasco AJ, Lowenfels AB, Pasker de Jong P. Review article: epidemiology of male breast cancer: a meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *Int J Cancer* 1993; 53 (4): 538–49.
12. Thomas DB, Jimenez LM, McTiernan A, et al. Breast cancer in men: risk factors with hormonal implications. *Am J Epidemiol* 1992; 135 (7): 734–48.

ZAKLJUČKI

V našo študijo smo vključili 22 bolnikov z rakom dojke. Mutiran gen BRCA2 smo odkrili pri treh bolnikih. Pogostnost mutacije gena BRCA2 pri moških z rakom dojke v Sloveniji je 14 %, kar nas uvršča med populacije s srednjo stopnjo pogostnosti mutacije gena BRCA2 pri moških z rakom dojke.

Slovenska founder mutacija je bila do sedaj ugotovljena v devetih slovenskih družinah. Dva od devetih moških, ki imajo slovensko founder mutacijo gena BRCA2, sta zbolela za rakom dojke.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se zdravnikoma skupine za onkološko genetsko svetovanje prim. dr. Cvetki Bilban - Jakopin, dr. med., in doc. dr. Marku Hočevarju z Onkološkega inštituta v Ljubljani. Zahvaljujemo se tudi Eriku Tuegelsu, univ. dipl. biol., prof. dr. Jacquesu De Grevu in Guidu Goelenu, univ. dipl. biol., iz Laboratorija za onkološko genetiko Svobodne univerze v Bruslju ter mag. Vidi Voršič Stegel, univ. dipl. biol. iz Imunološkega laboratorija Onkološkega inštituta v Ljubljani, saj je njihovo natančno in zamudno delo omogočilo izvedbo raziskave.

13. Hecht JR, Winchester DJ. Male breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994; 102 (4 Suppl 1): S25–30.
14. Donegan WL, Redlich PN. Breast cancer in men. *Surg Clin North Am* 1996; 76 (2): 343–63.
15. Syrjäkoski K, Kuukasjärvi T, Waltering K, et al. BRCA2 mutations in 154 finnish male breast cancer patients. *Neoplasia* 2004; 6 (5): 541–5.
16. Palli D, Masala G, Mariani-Costantini R, et al. A gene-environment interaction between occupation and BRCA1/BRCA2 mutations in male breast cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40 (16): 2474–9.
17. Genetics of Breast and Ovarian Cancer (PDQ[®]). CancerNet. Dosegljivo na <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/HealthProfessional>
18. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risk of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 73 (3): 709.
19. Krajc M, Bešič N, Hočevar M, et al. Onkološko genetsko svetovanje za dedni rak dojke in/ali jajčnikov – 4 letne izkušnje Skupine za Onkološko genetsko svetovanje. In: Bešič N, Anderluh F, Benedik J, et al. *Novosti v onkologiji in smernice za obravnavo bolnic z rakom dojke in bolnikov z malignim melanomom – 17. Onkološki vikend; 2004 Jun 4–5; Laško, Slovenija. Ljubljana: Kancerološko združenje Slovenskega zdravniškega društva, Onkološki inštitut, Zveza slovenskih društev za boj proti raku; 2004.*
20. Žgajnar J, Hočevar M, Bešič Nikola. Genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer. Our experience at the Institute of oncology in Ljubljana, Slovenia. *Eur J Cancer* 2002; 38 (Suppl 3): S77.
21. Cvelbar M, Uršič - Vrščaj M, Rakar S. Dvojni primarni rak jajčnikov in dojke: dejavniki tveganja in napovedni dejavniki. *Onkologija* 2005; 1: 40–4.
22. Uršič - Vrščaj M, Bešič N, Hočevar M, et al. Praktični napotki za genetsko svetovanje: rak jajčnikov in dojke. In: Lindtner J, Štabuc B, Bešič N, et al. *Doktrini zdravljenja bolnikov z malignimi limfomi in bolnic z rakom roditelja – 16. Onkološki vikend; 2002 Nov 22–23; Laško, Slovenija. Ljubljana: Kancerološko združenje Slovenskega zdravniškega društva, Onkološki inštitut, Zveza slovenskih društev za boj proti raku; 2002.*
23. Krajc M, Hočevar M. Analiza mutacij na genih BRCA1 in BRCA2 pri slovenskih družinah z rakom dojke in jajčnika. *Onkologija* 2002; 6 (2): 55–7.
24. Ganguly T, Dhulipala R, Godmilow L, et al. High throughput fluorescence-based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) identifies six unique BRCA2 mutations and an overall low incidence of BRCA2 mutation in high-risk BRCA1-negative breast cancer families. *Hum Genet* 1998; 102 (5): 549–56.
25. Warner E, Foulkes W, Goodwin P, et al. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected Ashkenazi Jewish Women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91 (14): 1241–7.
26. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, et al. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nature Genet* 1996; 14 (2): 185–7.
27. Wolpert N, Warner E, Seminsky MF, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in male breast cancer patients in Canada. *Clin Breast Cancer* 2000; 1 (1): 57–63.
28. Pages S, Caux V, Stoppa-Lyonnet D, et al. Screening of male breast cancer and of breast-ovarian cancer families for BRCA2 mutations using large bifluorescent amplicons. *Br J Cancer* 2001; 84: 482–8.
29. Struewing JP, Coriaty ZM, Ron E. Founder BRCA1/2 mutations among male patients with breast cancer in Israel. *Am J Hum Genet* 1999; 65 (6): 1800–2.
30. Diez O, Cortes J, Domenech M, et al. BRCA2 germ-line mutations in Spanish male breast cancer patients. *Ann Oncol* 2000; 11: 81–4.
31. Mavraki E, Gray IC, Bishop DT, et al. Germ line BRCA2 mutations in men with breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1428–31.
32. Evans DG, Bulman M, Young K, et al. High detection rate for BRCA2 mutations in male breast cancer families from North West England. *Fam Cancer* 2001; 1 (3–4): 131–3.
33. Basham VM, Lipscombe JM, Ward JM, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4 (1): R2. Epub Nov 2001. Dosegljivo na: www.pubmedcentral.gov
34. Couch FJ, Farid LM, DeShano ML, et al. BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nature genetics* 1996; 13 (1): 123–5.
35. Gorski B, Byrski T, Huzarski T, et al. Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66 (6): 1963–8.
36. Krajc M, De Greve J, Goelen G, et al. BRCA2 founder mutation in Slovenian breast cancer families. *Eur J Hum Genet* 2002; 10 (12): 879–82.
37. Pohlreich P, Stribrna J, Kleibl Z, et al. Mutations of the BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer in Czech Republic. *Med Princ Pract* 2003; 12 (1): 23–9.
38. Shih HA, Nathanson KL, Seal S, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6 (11): 4259–64.
39. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 1997; 17 (3): 341–5.