

## Artykuł na zaproszenie redakcji

### **Molekularna patogeneza zespołu Nijmegen. Implikacje dla postępu wiedzy o mechanizmach rozwoju nowotworów na podłożu defektów łączenia dwuniciowych pęknięć DNA**

Jan Steffen i Jan K. Siwicki

*Zespół Nijmegen (NBS) należy do grupy zespołów niestabilności chromosomowych. Obok charakterystycznych dysmorfii kardynalnymi cechami fenotypu chorych na NBS są: 1. występowanie samoistnych pęknięć i strukturalnych rearanżacji chromosomów, zwłaszcza w limfocytach oraz znacznie zwiększona wrażliwość na promieniowanie jonizujące; 2. zaburzenia odporności humoralnej i komórkowej oraz nawracające zakażenia bakteryjne; 3. hipogonadyzm hipogonadotropowy występujący u dziewcząt w okresie pokwitania; 4. nadwrażliwość na światło i zaburzenia upigmentowania skóry; 5. bardzo częste zachorowania na chłoniaki typu B i inne nowotwory złośliwe, które występują u około 40% chorych przed 20 r.ż.. Większość znanych zachorowań na zespół Nijmegen rozpoznano w Polsce.*

*Odkrycie genu NBS1 i jego produktu białkowego – nibryny oraz zidentyfikowanie dziedzicznych mutacji tego genu umożliwiło wyjaśnienie w ogólnym zarysie wszystkich istotnych elementów molekularnej patogenezy zespołu Nijmegen oraz poznanie nieznanymi wcześniej elementów mechanizmu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, które pojawiają się zarówno w procesach fizjologicznej rekombinacji genetycznej, jak i pod wpływem działania promieniowania jonizującego, cytostatyków radiomimetycznych i wolnych rodników tlenowych. Badania nad nibryną przyczyniły się ponadto do poznania szeregu funkcjonalnych sprzężeń pomiędzy białkami – produktami różnych genów, kontrolujących naprawę uszkodzonego DNA i normalne procesy rekombinacji genetycznej, cykl proliferacyjny komórek i apoptozę oraz stabilność telomerów. Te funkcjonalne sprzężenia zapewniają homeostazę podstawowych procesów życiowych na poziomie komórkowym. Zaburzenia tych procesów, które występują często równolegle, prowadzą do rozwoju nowotworów, zarówno w następstwie nieprawidłowego przebiegu normalnej rekombinacji genów, jak i działania niektórych czynników rakotwórczych. Z najnowszych badań wynika, że tzw. słowiańska mutacja genu NBS1 występuje w populacji Polski z częstością przekraczającą 0,5%, a ryzyko zachorowania jej heterozygotycznych nosicieli na nowotwory złośliwe jest ponad 4-krotnie zwiększone. Wskazano na kierunki badań, które powinny rozstrzygnąć, jak wielki jest udział nosicielstwa tej mutacji w zachorowalności na nowotwory złośliwe w skali populacyjnej w Polsce oraz na prawdopodobne związki pomiędzy nosicielstwem defektów NBS1 z występowaniem zwiększonych odczynów popromiennych i być może również z promieniowrażliwością nowotworów.*

#### **Studies on the Nijmegen breakage syndrome offer an insight into the mechanisms of tumour development resulting from defects of DNA double-strand break repair**

*Patients with the Nijmegen breakage syndrome (NBS) display the following cardinal features, shared in part with homozygous carriers of other chromosomal instability syndromes: (i) spontaneous chromosomal breaks and chromosomal rearrangements and enhanced cellular X- and gamma-ray sensitivity; (ii) immune deficiencies and recurrent infections; (iii) female hypogonadism; (iv) light hypersensitivity and skin pigmentation abnormalities; (v) strong predisposition for B-cell lymphomas and other tumours which develop in about 40% of disease carriers, before the age of 20. Half of the presently known cases of NBS were diagnosed in Poland.*

*The discovery of the NBS1 gene and studies on normal and mutant nibrin, which is the product of this gene, resulted in elucidation, in general outline, of the molecular pathogenesis of the Nijmegen breakage syndrome. In addition, these studies contributed considerably to the understanding of previously unknown elements of the mechanisms of double-strand DNA break rejoining in normal genetic recombination and in repair of DNA damage induced by ionizing radiations, radiomimetic drugs and free oxygen radicals. One of the breakthrough points was the discovery of several, previously unknown functional*

links between several proteins, products of various genes, involved in genetic recombination, DNA damage repair, control of cell cycle apoptosis and telomere maintenance. This explains why all the above processes, which under normal conditions are essential in maintaining homeostasis at the cellular level, become disrupted or de-regulated all at once, bringing on the development or many tumours.

It was recently reported that the frequency of heterozygous *NBS1* germline mutations in Poland exceeds 0.5% and that carriers of these mutations have an over 4-fold increased risk of cancer. Further studies, necessary to provide a more detailed information on risk of tumours at various sites, as well as on enhanced radiotherapy responses of normal tissues and tumours arising in heterozygous *NBS1* mutation carriers, are discussed.

**Słowa kluczowe:** zespół Nijmegen, gen *NBS1*, ryzyko zachowania na nowotwory złośliwe, heterozygotyczni nosiciele  
**Key words:** Nijmegen Breakage Syndrome, *NBS1* gene, cancer predisposition, heterozygous carriers

Zespół Nijmegen (The Nijmegen Breakage Syndrome – NBS) jest recesywnie dziedziczną chorobą dysmorficzną, z grupy tzw. zespołów niestabilności chromosomowej, szczególnie często występującą w Europie Środkowej. Na obraz tego zespołu składają się m.in.: małogłowie, pierwotny niedobór wzrostu, zazwyczaj umiarkowane upośledzenie umysłowe, nawracające zakażenia bakteryjne, wybitnie zwiększona wrażliwość na promieniowanie jonizujące i bardzo silna predyspozycja do rozwoju chłoniaków typu B i innych nowotworów złośliwych – występująca już w dzieciństwie i w wieku dojrzewania. Zidentyfikowanie genu *NBS1*, którego dziedziczne mutacje są podłożem tej choroby, umożliwiło ostatnio osiągnięcie bardzo istotnego postępu w badaniach nad zaburzeniami naprawy niektórych typów uszkodzeń DNA, które prowadzą często do rozwoju nowotworów złośliwych oraz stworzyło podstawy do podjęcia populacyjnych badań nad zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory u heterozygotycznych nosicieli mutacji tego genu, które – według pośrednich oszacowań – może być przyczyną nawet około 2% zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce.

### Kliniczny obraz zespołu Nijmegen

Pierwszy opis zespołu Nijmegen przedstawili w roku 1979 Hustinx i wsp. [1], a w roku 1985 Seemanova i wsp. [2] opisali kilka rodzinnych przypadków o podobnym fenotypie – stąd też zespół ten nosił przez pewien czas drugą nazwę – zespół Seemanovej II. Podobny typ dysmorfii opisali w roku 1988 Wegner i wsp. [3], jako wariant *ataxia-teleangiectasia*, nazwany „Berlin Breakage Syndrome”. Większość spośród znanych obecnie 85 przypadków zachorowań na zespół Nijmegen opisali K. Chrzanowska i współpracownicy z Instytutu – Pomnika Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie [4, 5]. Prace K. Chrzanowskiej i współpracowników przyczyniły się też w sposób bardzo istotny do ustalenia cech fenotypu chorych na NBS, w tym różnicujących ten zespół od zespołu Bloom’a i *ataxia-teleangiectasia*. Długą dyskusję, czy NBS jest odrębną jednostką nozologiczną, czy tylko nietypowym wariantem jednego z wyżej wymienionych zespołów, rozstrzygnęło ostatecznie wykrycie genu *NBS1*, którego dziedziczne mutacje okazały się przyczyną zachorowań na zespół Nijmegen [6, 7].

Typowymi dysmorfiami występującymi u chorych na zespół Nijmegen są: małogłowie z wyeksponowaną środ-

kową częścią twarzoczaszki i pierwotny niedobór wzrostu; u części chorych występują także anomalie rozwojowe nerek i śledziona, hipoplazja grasicy, zwężenie odbytu oraz syn-i klinodaktylia. W dalszym rozwoju pojawia się zazwyczaj umiarkowane upośledzenie umysłowe, a u dziewcząt, które osiągnęły wiek pokwitania – hipogonadyzm hipergonadotropowy; pewne cechy hipogonadyzmu występują też u chłopców chorych na ten zespół. U wielu chorych występują też zmiany na skórze – nadwrażliwość na światło, zaburzenia upigmentowania i niekiedy bielactwo [5, 8].

Niektóre dysmorfie opisane w zespole Nijmegen występują także w zespole Bloom’a: (małogłowie, pierwotny niedobór wzrostu, nadwrażliwość na światło). W przeciwieństwie do chorych na *ataxia-teleangiectasia*, u chorych na zespół Nijmegen nie rozwija się bezład mózdkowy, a charakterystyczne poszerzenia drobnych naczyń krwionośnych (teleangiektazje) występują tylko u części z nich, głównie na spojówkach [8-10].

Cechami wspólnymi zespołu Nijmegen, *ataxia-teleangiectasia*, zespołu Bloom’a i zespołu Fanconiego są: 1. występowanie w limfocytach z krwi licznych złamań chromosomów oraz translokacji i inwersji chromosomowych, które powstają wskutek nieprawidłowej naprawy takich złamań; 2. niedobory immunologiczne i nawracające zakażenia bakteryjne oraz: 3. wybitnie zwiększona zachorowalność na nowotwory złośliwe, która jest główną przyczyną wczesnych zgonów chorych na te zespoły [9]. Złamania chromosomowe oraz inwersje i translokacje w hodowlach limfocytów u chorych na *ataxia-teleangiectasia*, jak i u chorych na zespół Nijmegen, dotyczą głównie chromosomów 7 i 14 – w miejscach, w których występują fizjologiczne rearanżacje, związane z tworzeniem się genów kodujących immunoglobuliny i receptory limfocytów T. Niedobory immunologiczne, występujące u znacznego odsetka chorych na zespół Nijmegen, polegają zazwyczaj na obniżeniu poziomów immunoglobulin A i G, zmniejszeniu bezwzględnej i względnej liczby limfocytów T CD4 (które wspomagają odpowiedź humoralną i swoiste antygenowo reakcje cytotoksyczne) i na upośledzonej odpowiedzi proliferacyjnej komórek krwi na mitogeny. Nawracające zakażenia bakteryjne występują głównie w układzie oddechowym i w drogach moczowych [10]. Charakterystyczną cechą wspólną *ataxia-teleangiectasia* i zespołu Nijmegen jest znacznie zwiększona wrażliwość komórek na promieniowanie jonizujące o wysokich ener-

giach oraz na cytostatyki o działaniu radiomimetycznym, indukujące pęknięcia obu nici DNA. Tej zwiększonej promieniowrażliwości, występującej u chorych na oba omawiane zespoły, towarzyszy ponadto występowanie syntezy DNA odpornej na napromieniowanie (*radioresistant DNA synthesis* – RDS), co wskazuje na upośledzenie – zarówno u chorych na NBS, jak i na *ataxia-telangiectasia*, – normalnego mechanizmu, polegającego na zatrzymaniu syntezy DNA w komórkach do czasu naprawienia uszkodzeń [9, 11].

Zachorowania na nowotwory złośliwe, głównie na chłoniaki z komórek B, występują u blisko 40% chorych na zespół Nijmegen – przed 21 rokiem życia; jest to częstość dwukrotnie większa niż u chorych na *ataxia-telangiectasia* [12]. Poza chłoniakami niezłośliwymi typu B zarejestrowano u chorych na zespół Nijmegen także zachorowania na inne chłoniaki niezłośliwe, ziarnicę złośliwą, białaczkę, guzy mózgu (*medulloblastoma*) i mięsaka (*rhabdomyosarcoma*) [5, 8]. U dwóch chorych opisano guzy metachroniczne w innych lokalizacjach niż guzy pierwotne [13]. Dotychczas nie odnotowano jeszcze u chorych na NBS zachorowań na raki skóry i narządów wewnętrznych, bardzo częste w 3-ciej i 4-tej dekadzie życia u chorych na zespół Bloom'a [14]; przeważająca większość znanych chorych na zespół Nijmegen nie osiągnęła jednak tego wieku.

Wybitna promieniowrażliwość komórek u chorych na zespół Nijmegen jest – podobnie jak u chorych na *ataxia-telangiectasia* [15] – przyczyną gwałtownych odczynów popromiennych w przebiegu leczenia nowotworów u tych chorych standardową dawką promieniowania gamma. Zwiększona wrażliwość na cytostatyki radiomimetyczne warunkuje także konieczność modyfikowania u tych chorych chemioterapii; co najmniej u jednego chorego po leczeniu cytostatykami rozwinęła się agammaglobulinemia [11].

Chłoniaki niezłośliwe, rozwijające się u dużego odsetka chorych z zespołem Nijmegen, w całej populacji dzieci są nowotworami rzadkimi; można więc przypuszczać, że znaczący odsetek wszystkich wczesnych zachorowań na te nowotwory w Europie Środkowej występuje u chorych na NBS. Nadmierne reakcje tych chorych na standardowe leczenie przeciwnowotworowe i zagrażające powikłania, np. załamanie się odporności, mogą więc być istotnym problemem w onkologii wieku rozwojowego.

### **Funkcje genu *NBS1* – molekularna patogeneza zespołu Nijmegen**

W roku 1997 dwa zespoły posługujące się różnymi metodami – analizy komplementacji genetycznej i analizy sprzężeń genów – zlokalizowały w badaniach u chorych na zespół Nijmegen w ramieniu długim chromosomu 8 w locus 21 nieznanym wcześniej gen *NBS1*, którego dziedziczne mutacje warunkują zachorowania na ten zespół [6, 7]. Spośród sześciu poznanych dotąd dziedzicznych mutacji *NBS1*, wszystkie powodują przedwczesne przerwanie syntezy kodowanego przez ten gen białka – nibryny. U wszystkich chorych na zespół Nijmegen z Europy Środ-

kowej i Wschodniej zidentyfikowano tę samą mutację polegającą na delecji (utracie) 5 par zasad – ACAA- w kodonach 657 – 661 tego genu (tzw. „mutacja słowiańska”) [8]. Tę samą mutację znaleziono także u kilku innych chorych na zespół Nijmegen z innych regionów świata, których przodkowie prawdopodobnie wywodzili się z Europy Środkowej [16]. Inne dziedziczne mutacje genu *NBS1* rozpoznano dotąd tylko w pojedynczych przypadkach [8].

Jeszcze przed wykryciem genu *NBS1*, w badaniach nad składem kompleksu naprawczego dwuniciowych pęknięć DNA, zidentyfikowano białko, określone najpierw symbolem p95 [17], które okazało się następnie identyczne z produktem genu *NBS1* – nibryną [18, 19]. Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej *NBS1* oraz bezpośrednich badań rozpoznano w nibrynie m.in. dwie wcześniej znane domeny [17]: 1. BRCT, która występuje w wielu innych białkach zaangażowanych w naprawę DNA oraz w regulację cyklu życiowego komórek i apoptozy [20]; 2. FHA, która została wcześniej zidentyfikowana w białkach uczestniczących w rekombinacji genetycznej, polegającej na wymianie materiału genetycznego pomiędzy homologicznymi chromosomami w mejozie [21]. W znanych dziedzicznych mutacjach *NBS1* obie te domeny są zachowane, utracie podlega natomiast ta część nibryny, w której występują sekwencje aminokwasów, warunkujące jej wiązanie z białek (Mre11) zaangażowanych w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA [19].

Badania strukturalne nibryny i mechanizmów jej aktywacji w komórkach chorych na zespół Nijmegen i komórkach normalnych umożliwiły – poza poznaniem, w ogólnym zarysie, molekularnej patogenezy zespołu Nijmegen – uzupełnienie o szereg istotnych elementów wcześniejszej wiedzy o mechanizmach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, w tym zwłaszcza dotyczących wzajemnych oddziaływań białek, kontrolowanych przez różne geny, zaangażowanych w tych procesach.

Pęknięcia obu nici DNA powstają nie tylko w wyniku ekspozycji na niektóre mutageny, w tym zwłaszcza promieniowanie jonizujące o wysokich energiach, cytostatyki radiomimetyczne i wolne rodniki tlenowe – lecz także w procesach normalnej rekombinacji genetycznej, która zachodzi w mejozie w komórkach rozrodczych (*crossing-over* – wymiana fragmentów pomiędzy homologicznymi chromosomami, która warunkuje niezależną segregację genów – drugie prawo Mendla) oraz w limfocytach B i T, w których procesy rekombinacyjne są niezbędne dla powstawania ogromnej liczby wariantów genów kodujących przeciwciała i receptory dla różnych antygenów [22]. Nieprawidłowa naprawa dwuniciowych pęknięć DNA prowadzi do strukturalnych aberracji chromosomów – zwłaszcza translokacji (przemieszczenie fragmentu chromosomu na inny chromosom), inwersji (wbudowanie fragmentu chromosomu do tego samego chromosomu po obrocie o 180°) lub delecji (utrata części materiału genetycznego). Obecnie wiadomo, że niektóre z tych strukturalnych aberracji, w tym zwłaszcza translokacje chromosomowe, są przyczynowo związane z rozwojem niektórych nowotworów złośliwych u ludzi, zwłaszcza białaczek, chłoniaków i mięsaków [23].

Proces naprawy dwuniciowych pęknięć DNA może zachodzić poprzez dwa mechanizmy [22, 24]. Pierwszy z nich – znany pod nazwą „łączenia niehomologicznych końców” (*non-homologous end joining* – NHEJ), zachodzi głównie w fazach G0 i G1 cyklu komórkowego, i polega na połączeniu końców pękniętych nici DNA, które pozostają w fizycznym kontakcie. W badaniach na innych gatunkach, a następnie u ludzi, zidentyfikowano dwa białka: Rad50 i Mre11, które w kompleksie z trzema innymi białkami są niezbędne w powyższym mechanizmie naprawy. Nibryna jest częścią tego kompleksu [17], w którym niedawno zidentyfikowano także białko – produkt genu silnej predyspozycji do raka piersi – *BRCA1* [25]. Drugi mechanizm naprawy dwuniciowych pęknięć DNA – występujący głównie w fazach S i G2 cyklu komórkowego – wykorzystuje jako matrycę do naprawy homologicznej chromosom (*homologous recombination* – HR). Proces ten zachodzi z udziałem kompleksu białek Rad51-57, Brca1 i Brca2, a jego przebieg jest mniej precyzyjny. Pomyłki w naprawie poprzez mechanizm HR są przede wszystkim skutkiem błędnego rozpoznania homologii z chromosomem służącym jako matryca. Wskutek takich pomyłek dochodzi do utraty zazwyczaj więcej niż 40 par zasad i powstawania pęknięć chromatyd, widocznych w metafazie pod mikroskopem. Defekt występujący u chorych na zespół Nijmegen polega głównie na niesprawności naprawy poprzez mechanizm NHEJ, natomiast obserwowane uszkodzenia chromosomów wynikają, jak się wydaje, z błędnej naprawy w mechanizmie HR, który działa kompensacyjnie [12]. Głębszy wgląd w funkcję nibryny w procesach naprawy uszkodzonego DNA stał się możliwy głównie dzięki badaniom tych procesów w napromienianych komórkach od chorych na NBS.

W normalnych komórkach, po ich napromienianiu, kompleksy białek, w skład których wchodzi Rad50 i Mre11, przemieszczają się w miejsca uszkodzeń; ujawnia się to pojawieniem się w jądrach tych komórek licznych ziarnistości, które można uwidaczniać stosując przeciwciała przeciwko białkom tego kompleksu [26]. W napromienianych komórkach chorych na zespół Nijmegen, takie ziarnistości nie występują – co sugeruje, że jedną z głównych funkcji nibryny jest przemieszczanie białek kompleksu naprawczego w miejsca dwuniciowych pęknięć DNA [19]. Bezpośrednim skutkiem napromieniania normalnych komórek jest zahamowanie syntezy DNA wskutek bloku w „punkcie kontrolnym” G1/S, indukowanym przez białko p53, które przyjmuje w komórkach uszkodzonych stabilną konfigurację i gromadzi się w nadmiarze. Napromieniane komórki od chorych na NBS kontynuują natomiast syntezę DNA, a akumulacja p53 jest w nich mniej nasilona i opóźniona [27]. Wynika stąd, że nibryna jest jednym z białek, które prawdopodobnie poprzez oddziaływanie na p53, uczestniczą także w regulacji mechanizmu umożliwiającego naprawę uszkodzeń DNA poprzez przejściowe zahamowanie jego syntezy. Komórki napromieniane mogą być również blokowane w fazie G2, a więc krótko przed podziałem mitotycznym. Dotychczasowe dane, dotyczące funkcjonowania tego bloku w komórkach chorych na zespół Nijmegen, są sprzeczne [28, 29].

Dalszy wgląd w funkcje nibryny, polegający na jej oddziaływaniach z białkami – produktami różnych genów zaangażowanych w naprawę uszkodzonego DNA i kontrolę cyklu komórkowego, umożliwiły m.in. badania jej funkcjonalnych powiązań z produktem genu *ATM*, którego mutacje są podłożem zachorowań na *ataxia-telangiectasia* (AT). Białko Atm (produkt genu *ATM*) należy do rodziny kinaz białkowych, których główną funkcją jest przenoszenie sygnałów aktywujących produkty innych genów komórkowych. W badaniach u chorych na *ataxia-telangiectasia*, a następnie także w badaniach na komórkach zwierzęcych pozabawionych genu *ATM*, wykazano, że aktywacja Atm jest jedną z najwcześniejszych odpowiedzi komórek na niektóre uszkodzenia występujące w ich genomie, np. pod wpływem napromieniania. Mechanizm tej odpowiedzi polega na fosforylacji przez Atm kilku białek, w tym p53, kontrolujących przejście komórek do fazy S i mitozy – co prowadzi do ich stabilizacji i akumulacji i – w dalszej sekwencji – do kaskadowej aktywacji produktów innych genów, indukujących blok w „punktach kontrolnych” G1/S i G2. W komórkach chorych na *ataxia-telangiectasia* zwiększonej promieniowrażliwości towarzyszy zaburzenie indukcji bloków w obu tych punktach [30]; upośledzone jest także przemieszczanie kompleksu Rad50/Mre11 w miejsca uszkodzeń DNA [31]. Skutki mutacji genu *ATM* i *NBS1* są więc w wielu elementach podobne – co dowodzi, że ich produkty są funkcjonalnie sprzężone w procesach naprawy uszkodzeń DNA i kontroli cyklu życiowego. W kilku badaniach opublikowanych w bieżącym roku wykazano, że *ATM* aktywuje w komórkach napromienianych nibrynę, poprzez fosforylację niektórych reszt serynowych w dystalnej części tego białka, która u chorych na zespół Nijmegen znajduje się w obszarze delecji. Zablockowanie procesu fosforylacji nibryny prowadzi do zaburzeń relokacji kompleksu Rad50/Mre11 w miejsce złamań i do zaburzeń w blokowaniu komórek napromienianych w punkcie G1/S [32–34]. Wynika stąd, że funkcja nibryny polega m.in. na przenoszeniu sygnału, inicjowanego przez aktywację Atm, który indukuje przemieszczenie się kompleksu naprawczego w komórkach, w których powstały dwuniciowe pęknięcia DNA w miejsce tych uszkodzeń. Równolegle znaleziono jednak dowody, że funkcje genów *NBS1* i *ATM* nie są identyczne. W szczególności, produkt normalnego genu *ATM* indukuje zwiększoną ekspresję białka p53 także w komórkach pozabawionych nibryny [27, 35]. Gen *ATM* jest również zaangażowany w mechanizm naprawy w fazie G2 poprzez rekombinację homologiczną (HR) [9, 22]. Z kolei nibryna podlega także aktywacji – bez udziału Atm – w komórkach, w których pojawiają się uszkodzenia pojedynczych nici DNA, np. pod wpływem UV [33]. Niektóre wątki badań nad dalszymi funkcjami nibryny zaczynają się dopiero rysować.

Obraz wzajemnych funkcjonalnych powiązań Atm i nibryny z białkami naprawczymi, kontrolującymi cykl komórkowy i apoptozę, przedstawiony tutaj tylko w ważniejszych elementach, jest z pewnością jeszcze niepełny. Znane elementy tych powiązań umożliwiają jednak, w ogólnym zarysie, zrozumienie molekularnej patogenezы zespołu Nijmegen [12, 24, 36].

Opisane dotąd dziedziczne defekty genu *NBS1* powodują u homozygotycznych nosicieli głębokie upośledzenie mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA typu „łączenie niehomologicznych końców” (NHEJ) w fazie G1. W dodatku – wskutek niesprawności „punktu kontrolnego” G1/S – uszkodzenia te są powielane. W fazie G2 włącza się co prawda mechanizm naprawy homologicznej, który może jednak prowadzić do utraty znacznej liczby zasad DNA (mikrodelecje, widoczne w metafazie jako złamania chromosomowe) i zwiększenia liczby błędnych połączeń (translokacje i inwersje). Ostatnio stwierdzono również, że nibryna obecna jest na naturalnych końcach chromosomów (telomerach) w połączeniu z białkami TRF1 oraz TRF2, które warunkują właściwą architekturę telomerów oraz mają wpływ na regulację aktywności telomerazy [37–39]. Świadczy to o udziale nibryny w regulacji długości telomerów i tłumaczy, dlaczego utrata jej funkcji może mieć istotne znaczenie w powstawaniu aberracji, np. na skutek fuzji „koniec do końca” niehomologicznych chromosomów – zjawiska często występującego w komórkach chorych na NBS.

Mechanizm naprawy podwójnych pęknięć nici DNA poprzez łączenie niehomologicznych końców w fazie G1 ma podstawowe znaczenie w tworzeniu – poprzez rekombinację – różnych genów kodujących przeciwciała syntetyzowane przez limfocyty B i receptory dla antygenów na limfocytach T [20]. Dlatego też skutki upośledzenia naprawy poprzez mechanizm NHEJ ujawniają się głównie w komórkach układu odpornościowego; złamania chromosomowe widoczne pod mikroskopem w hodowlach limfocytów od chorych na NBS i AT występują bowiem głównie w miejscach fizjologicznej rekombinacji genów immunoglobulin i receptorów antygenowych limfocytów T w chromosomach 7 i 14. Skutkiem niesprawności rekombinacji prowadzącej do generowania różnych genów kodujących przeciwciała dla immunoglobulin i receptory dla antygenów jest obserwowany u chorych na NBS niedobór immunoglobulin G i A oraz zmniejszona liczebność limfocytów T typu CD4, które spełniają funkcje wspomagające w odpowiedzi immunologicznej [4]. Opisane niedobory tłumaczą m.in. częstą zachorowalność dzieci z NBS na choroby infekcyjne. Rozwój nowotworów, głównie chłoniaków, tłumaczy się nieprawidłową naprawą dwuniciowych pęknięć DNA, która może prowadzić do translokacji przyczynowo związanych z rozwojem tych nowotworów.

Białka kompleksu Rad50/Mre11, w tym prawdopodobnie także nibryna, uczestniczą ponadto w procesie rekombinacji genetycznej w komórkach rozrodczych. Przemawia za tym fakt obecności w cząsteczce nibryny domeny FHA, występującej także w różnych białkach uczestniczących w rekombinacji mejotycznej. Hipogonadyzm hipergonadotropowy opisany u dziewcząt z NBS, które osiągnęły wiek dojrzewania, może więc mieć związek z niesprawnością rekombinacji mejotycznej. Ten typ hipogonadyzmu w innych zespołach wrodzonych dysmorfii, w tym m.in. w *ataxia-telangiectasia*, jest podłożem do rozwoju złośliwych guzów jajnika typu *dysgerminoma*. Dotychczas nie obserwowano co prawda takich guzów u kobiet z NBS, lecz liczba chorych na ten zespół, w typowym

dla rozwoju tego nowotworu wieku, jest bardzo niewielka.

U chorych na zespół NBS obserwuje się także charakterystyczne zmiany na skórze [5, 8]. Wydaje się prawdopodobne, że pozostają one w związku z udziałem nibryny w naprawie uszkodzeń występujących tylko w jednej nici DNA, powstających m.in. pod wpływem promieniowania UV. Czas obserwacji i przeżycia znanych chorych na NBS nie pozwala jak dotąd na rozstrzygnięcie, czy omawiane zmiany mogą być podłożem do rozwoju złośliwych nowotworów (raków i czerniaków) w skórze. Warto jednak podkreślić, że podstawnokomórkowe i płaskokomórkowe raki skóry rozwijają się bardzo często, zwłaszcza w czwartej dekadzie życia, u chorych na zespół Bloom’a, w którym także występuje nadwrażliwość na światło i zaburzenia pigmentacji skóry [14]. Od dawna wiadomo również, że raki skóry rozwijają się często jako drugie nowotwory u chorych na chłoniaki [40].

Niektóre cechy dysmorficzne typowe dla zespołu Nijmegen, mogą – jak się przypuszcza – być uwarunkowane nasileniem procesów apoptozy, które prowadzą do eliminacji części uszkodzonych komórek. Powiązania funkcjonalne pomiędzy genami *ATM* i *NBS1*, przy jednoczesnych różnicach w niektórych elementach ich działania, tłumaczą z jednej strony podobieństwo fenotypów homozygotycznych nosicieli defektów każdego z tych genów i jednocześnie są prawdopodobnym podłożem niektórych różnic w tych fenotypach [9].

Względnie niedawno postawiono pytanie, czy defekty genu *NBS1* mogą się także pojawiać – podobnie jak np. mutacje genów „*mismatch repair*”, kontrolujących inne mechanizmy naprawy uszkodzonego DNA, w procesie karcynogenezy w komórkach somatycznych. Na podstawie badań nad zespołem Nijmegen można łatwo przewidzieć, że skutkiem niektórych mutacji somatycznych w obu kopiach genu byłaby postępująca destabilizacja genomu, m.in. w następstwie mikrodelecji i przemieszczeń dużych segmentów chromatyny. We wstępnych badaniach, przedstawionych w bieżącym roku, stwierdzono istotnie, że mutacje somatyczne *NBS1* (zazwyczaj odmiennego typu i inaczej umiejscowione niż jego poznane dotąd defekty dziedziczne) występują względnie często u chorych na ostre białaczki. Przy okazji wykryto, że u pewnego odsetka tych chorych występują także dziedziczne mutacje genu *NBS1* [41].

Szersze znaczenie badań nad molekularną patogenezą zespołu Nijmegen i pozostałych zespołów niestabilności chromosomowej polega przede wszystkim na tym, że badania te umożliwiają głęboki wgląd w mechanizmy karcynogenezy, uwarunkowane defektami w przebiegu normalnych procesów rekombinacji genetycznej, które prowadzą praktycznie nieuchronnie do rozwoju nowotworów złośliwych, zwłaszcza – chociaż nie wyłącznie – w układzie odpornościowym [24, 42]. Nakłada się na to wybitna wrażliwość na niektóre czynniki rakotwórcze. Nieprawidłowa naprawa uszkodzeń DNA powstałych w wyniku działania tych czynników, prowadzi poprzez mechanizmy, które zostały przedstawione powyżej, do destabilizacji genomu i w konsekwencji do rozwoju niektórych nowotworów złośliwych.

## Ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe u heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *NBS1*

Zespół Nijmegen, podobnie jak wszystkie pozostałe zespoły niestabilności chromosomowej, jest dziedziczony jako cecha recesywna – co oznacza, że można go rozpoznać na podstawie charakterystycznych cech fenotypu tylko u homozygot, tj. nosicieli mutacji występujących w obu kopiach tego genu, odziedziczonych odpowiednio od ojca i od matki. W warunkach doboru losowego prawdopodobieństwo związku heterozygotycznych nosicieli rzadkich mutacji recesywnych jest niewielkie; jeżeli takie nosicielstwo występuje w całej populacji z częstością 1 na 100 to losowe prawdopodobieństwo związku pomiędzy heterozygotami – pomijając małżeństwa pomiędzy krewnymi – wynosi zaledwie 1 na 10 000. Uwzględniając, że choruje tylko jedno na czworo dzieci z takich związków (pozostałe będą jak ich rodzice heterozygotycznymi nosicielami mutacji lub też odziedziczą obie prawidłowe kopie genu), – to częstość zachorowań w opisanych warunkach będzie się kształtowała na poziomie 1 na 40 000 urodzeń. Częstość heterozygotycznego nosicielstwa defektów genowych, dziedziczonych recesywnie, jest więc wielokrotnie większa niż częstość zachorowań, występujących tylko u homozygotycznych nosicieli takich mutacji. K. Sperling i współpracownicy oszacowali niedawno częstość nosicielstwa „słowiańskiej mutacji” genu *NBS1* w Polsce na podstawie testów molekularnych w dużych próbach populacyjnych na nieco ponad 0,5% średnio dla całego kraju i na ponad 1% w Polsce Południowo-Wschodniej [43].

Recesywny charakter dziedziczenia zespołów niestabilności chromosomowych nie wyklucza występowania pewnych dysfunkcji w naprawie uszkodzonego DNA i/lub w regulacji cyklu proliferacyjnego komórek u heterozygotycznych nosicieli defektów genowych, występujących w tych zespołach. Mutacje genowe, których skutkiem może być utrata niektórych funkcji, np. związanych z aktywnością białek produktów danego genu, mogą nie zmieniać zdolności ich wiązania się z innymi normalnymi białkami, wchodzącymi w skład kompleksu. Takie kompleksy mogłyby konkurować, w komórkach heterozygotycznych nosicieli mutacji, z kompleksami biologicznie pełnowartościowymi, w miejscach ich działania [44]. Opisany mechanizm wydaje się być dość prawdopodobny w odniesieniu do heterozygotycznych mutacji genu *NBS1*; w znanych dziedzicznych mutacjach tego genu zachowane są bowiem dwie ważne domeny – BRCT i FHA – którym przypisuje się istotną rolę w oddziaływaniach pomiędzy białkami kompleksu naprawczego i kontrolującymi cykl komórkowy [12]. Alternatywnie bądź równolegle, u heterozygotycznych nosicieli defektów genu *NBS1* mogłoby dochodzić do powstawania klonów komórek obciążonych mutacjami w obu kopiach tego genu wskutek wymiany chromatyd pomiędzy homologicznymi chromosomami w komórkach somatycznych. W takich komórkach, na podłożu błędnej naprawy DNA, mogłoby dochodzić do inicjacji procesów karcynogenezy, prowadzących do rozwoju nowotworów.

Pierwsze epidemiologiczne dowody dokumentujące zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe,

w tym zwłaszcza około 5-krotnie zwiększone ryzyko zachorowania na raka sutka u „obligatoryjnych heterozygot” – bliskich krewnych chorych na *ataxia-telangiectasia*, przedstawili Swift i wsp. [45]. Oszacowania wielkości tego ryzyka w analogicznych badaniach innych autorów okazały się nieco niższe; głównym ograniczeniem w badaniach krewnych chorych na *ataxia-telangiectasia* była niewielka liczba heterozygot – stąd względne ryzyko zachorowania można było oszacować tylko w przybliżeniu [46]. Zlokalizowanie i poznanie sekwencji nukleotydowej genu *ATM* [47] otworzyło nowe możliwości badania tego problemu, polegające na analizach częstości heterozygotycznego nosicielstwa mutacji *ATM* u chorych na raka piersi. Wyniki tych badań okazały się z początku mało zachęcające, gdyż typowe mutacje prowadzące do delekcji białka *Atm* znajdowano u tych chorych niewiele częściej niż w całej populacji. Dopiero ostatnio okazało się, że zachorowania są bardzo znacząco zwiększone u nosicieli niektórych, trudno wykrywalnych, mutacji, polegających na zmianach w sekwencji nukleotydów, bez występowania delekcji w końcowej części białka; takie mutacje znaleziono m.in. u blisko 10% chorych na raka piersi w Wielkiej Brytanii i Holandii [44, 48, 49]. W wyniku wielu badań udało się także wykazać w sposób nie budzący wątpliwości, że komórki od heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *ATM* są bardziej wrażliwe na promieniowanie gamma niż komórki od ludzi nie obciążonych tych defektem [50, 51]. Opisany wynik stanowi więc niezależny dowód na to, że procesy naprawy uszkodzonego DNA są także, w pewnym stopniu upośledzone u heterozygot. Jak dotychczas brak natomiast danych dokumentujących jednoznacznie występowanie zwiększonych odczynów popromiennych u heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *ATM*.

Badania nad ryzykiem zachorowania na nowotwory u heterozygotycznych nosicieli dziedzicznych defektów genu *NBS1* znajdują się dopiero w początkowej fazie, gdyż liczba chorych, u których rozpoznano ten zespół, zwiększyła się znacząco dopiero w ostatnich latach. Ryzyko nowotworów u krewnych chorych na NBS badali dotąd tylko Seemanova i współpracownicy [52, 53]. Przedmiotem pierwszej pracy Seemanowej była analiza ryzyka krewnych zaledwie 8 chorych na zespół Nijmegen; tym niemniej statystycznie znamienne zwiększona zachorowalność na nowotwory występowała w tym badaniu we wszystkich grupach krewnych, u których prawdopodobieństwo heterozygotycznego nosicielstwa mutacji wynosiło odpowiednio 100, 50 a nawet 25%. Wyniki dalszych badań, w których analizowano ryzyko u blisko 200 heterozygot, u których nosicielstwo mutacji *NBS1* potwierdzono testem molekularnym, pozwalają oszacować poziom zwiększonego ryzyka zachorowania u nosicieli na wszystkie nowotwory łącznie na ponad 4. Obok zachorowań na białaczki i mięsaki oraz, sporadycznie, guzy jądra i wczesne nowotwory jajnika odnotowano liczne, względnie wczesne nowotwory w lokalizacjach najczęstszych także w ogólnej populacji [53]. Badana próba była jednak zbyt mała, aby określić wielkość ryzyka zachorowania nosicieli, na nowotwory w poszczególnych lokalizacjach narządowych.

Przyjmując za podstawę dane Sperlinga i współpracowników, dotyczące częstości heterozygotycznego nosicielstwa „mutacji słowiańskiej” genu *NBS1* [36] oraz oszacowania ryzyka nosicieli przedstawione przez Seemanową i współpracowników [53] można by szacować, że heterozygotyczne nosicielstwo tej mutacji jest w Polsce przyczyną około 2% (tj. około 2.000) zachorowań na nowotwory złośliwe rocznie. Uwzględniając doświadczenia z wczesnych badań ryzyka krewnych chorych na *ataxia-telangiectasia* [44] – problem wielkości ryzyka nosicieli mutacji genu *NBS1* należy jednak – do czasu przeprowadzenia dużych badań populacyjnych nad częstością germinalnych mutacji tego genu u chorych na nowotwory złośliwe, w krajach w których te mutacje występują w całej populacji z dużą częstością – uważać za jeszcze nierozstrzygnięty. Przeprowadzenie takich badań jest obecnie technicznie wykonalne, ponieważ mogą one być ograniczone do poszukiwania tylko jednej mutacji, tj. delecji pięciu par zasad w kodonach 657-661 genu *NBS1*.

Lokalizacje, w których można by oczekiwać zwiększonej częstości germinalnych heterozygotycznych mutacji *NBS1*, dotyczą w pierwszym rzędzie tych układów i narządów, których dysfunkcja ujawnia się w fenotypie chorych na NBS – tj. układu immunologicznego (chłoniaki i białaczki), gonad i centralnego układu nerwowego.

Bardzo interesujące wydaje się też poszukiwanie mutacji *NBS1* wśród chorych na raka piersi. Z badań nad nibryną – przedstawionych powyżej – wynika, że może być ona funkcjonalnie sprzężona z wszystkimi znanymi genami silnych predyspozycji do rozwoju tego nowotworu – tj. z *BRCA1*, *BRCA2*, *P53* i *ATM*! Co więcej, w Polsce w rodzinach chorych na raka piersi obserwuje się wielokrotnie częstsze występowanie zespołu Li-Fraumeni-like niż w krajach zachodnich [54]. Zespół Li-Fraumeni-like rozpoznaje się na podstawie występowania wśród krewnych 10 i 20 agregacji co najmniej dwóch zachorowań na nowotwory z tzw. spektrum Li-Fraumeni, tj. mięsaków, białaczek, guzów centralnego układu nerwowego, guzów nadnerczy i/lub wczesnego raka piersi; co więcej, tylko w 20-30% rodzin chorych na zespół Li-Fraumeni-like występują dziedziczne mutacje genu *P53*, a molekularne podłoże zachorowań w pozostałych rodzinach jest nieznane [55]; zachorowania w trzech pierwszych lokalizacjach (białaczki, mięsaki, guzy centralnego układu nerwowego) występuje typowo u chorych na zespół Nijmegen.

W kontekście częstego występowania u chorych na zespół Nijmegen nadwrażliwości na światło i zaburzeń upigmentowania skóry [5], udokumentowanej roli nibryny w naprawie uszkodzeń DNA, indukowanych przez promienie UV [33] i częstego występowania raków skóry na podłożu podobnych zmian u chorych na zespół Bloom'a [14] – obiecujące wydaje się także poszukiwanie germinalnych mutacji *NBS1* u chorych na raki skóry i czerniaki.

Innym obiecującym wątkiem badań może być poszukiwanie związków pomiędzy nosicielstwem mutacji genu *NBS1* a występowaniem u części chorych zwiększonych odczynów popromiennych w przebiegu radioterapii.

Zwiększoną wrażliwość komórek na promieniowanie X i gamma wykazano w badaniach heterozygotycznych nosicieli genu *ataxia-telangiectasia* [50, 51]; postulowano także częste występowanie odczynów popromiennych u nosicieli tego genu [56]. Jak dotąd brak analogicznych badań u heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *NBS1* chorych na nowotwory. Takie badania mogą też wnieść nowe informacje o promieniowrażliwości nowotworów. Z czysto teoretycznych przesłanek można przypuszczać, że będzie ona zwiększona w nowotworach u nosicieli germinalnych mutacji *NBS1*. Ponadto, wstępne badania u heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *ATM* sugerują, że raka piersi, rozwijającego się u nich w młodym wieku, charakteryzują pewne odrębności przebiegu, w tym zwłaszcza dłuższe przeżycia [57]. Uzasadnia to prowadzenie podobnych badań u nosicieli mutacji genu *NBS1*.

Badania nad genem *NBS1* wchodzą stopniowo w ostatnich kilku latach w centrum uwagi genetyków, biologów molekularnych i onkologów. W miarę postępu tych badań okazuje się, że nibryna – produkt tego genu – uczestniczy w wielu procesach: w normalnej rekombinacji i w naprawie uszkodzeń DNA, w regulacji cyklu proliferacyjnego i apoptozy oraz w kontroli długości telomerów. Równoległe zaburzenia tych procesów występują w wielu nowotworach złośliwych. Badania nad skutkami dziedzicznych mutacji genu *NBS1* umożliwiają więc głębski wgląd w naturę wzajemnych oddziaływań wielu różnych białek – produktów różnych genów – które w normalnych warunkach utrzymują homeostazę w przebiegu podstawowych procesów życiowych w komórkach i jednocześnie wgląd w naturę procesów karcynogenezy na podłożu zaburzeń rekombinacji genetycznej oraz nie naprawionych uszkodzeń DNA, indukowanych przez karcynogeny. Ważne, w aspekcie bliższym praktyki onkologicznej, jest pytanie o rolę mutacji *NBS1*, zwłaszcza u heterozygotycznych nosicieli w zachorowalności na nowotwory złośliwe w krajach Europy Środkowej. Istotne jest także ustalenie, czy nowotwory u heterozygotycznych nosicieli tych mutacji różnią się cechami przebiegu i wrażliwością na leczenie.

**Prof. dr hab. med. Jan Steffen**

Zakład Immunologii  
Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie  
ul. Roentgena 5  
02-781 Warszawa

## Piśmiennictwo

- Hustinx TW, Scheres JM, Weemaes CM i wsp. Karyotype instability with multiple 7/14 and 7/7 rearrangements. *Hum Genet* 1979; 49: 199-208.
- Seemanova E, Passarge E, Beneskova D i wsp. Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 1985; 20: 639-648.
- Wegner RD, Metzger M, Hanefeld F i wsp. A new chromosome instability disorder confirmed by complementation studies. *Clin Genet* 1988; 33: 20-32.

4. Chrzanowska KH, Kleijer WJ, Krajewska-Walasek M i wsp. Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: The Nijmegen Breakage Syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 57: 462–471.
5. Chrzanowska KH. Zespół Nijmegen (Nijmegen Breakage Syndrome). Analiza kliniczna i genetyczna. Rozprawa habilitacyjna. "Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka", Warszawa 1999.
6. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M i wsp. The gene for the ataxia telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1 cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 605–610.
7. Matsuura S, Weemaes C, Smeets D i wsp. Genetic mapping using microcell-mediated chromosome transfer suggests a locus for Nijmegen breakage syndrome at chromosome 8q21–24. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1487–1494.
8. Hiel JA, Weemaes CM, Van den Heuvel LP i wsp. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch Dis Childhood* 2000; 82: 400–406.
9. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen Breakage Syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 635–662.
10. Wegner RD, Chrzanowska K, Sperling K, Stumm M. Ataxia-telangiectasia variants (Nijmegen Breakage Syndrome). W: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM (red) *Primary Immunodeficiency Diseases. A Molecular and Genetic Approach*. New York; Oxford University Press; 1999, s. 324–34.
11. Weemaes CMR, Smeets DFCH, van der Burgt CJAM. Nijmegen Breakage Syndrome: a progress report. *Int J Radiat Biol* 1992; 66: s. 185–8
12. Digweed M, Reis A i Sperling K. Nijmegen Breakage Syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *BioEssays* 1999; 21: 649–656.
13. Weemaes CMR (and the NBS Study Group). Nijmegen Breakage Syndrome: clinical data of the first 55 patients in the NBS Registry. International Workshop on Nijmegen Syndrome, 8–11 June 2000, Częstochowa.
14. German J, Passarge E. Bloom syndrome. XII Report from the Registry for 1987. *Clin Genet* 1989; 35: 57–69.
15. Cunliffe PN, Mann JR, Cameron AH i wsp. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia *Br J Radiol* 1975; 48: 374–6.
16. Matsuura S, Tauch H, Nakamura A i wsp. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 1998; 19: 179–181.
17. Dolganov GM, Maser RS, Novikov A i wsp. Human Rad50 is physically associated with hMre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombination DNA repair. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4832–4841.
18. Varon R, Vissinga C, Platzer M i wsp. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen Breakage Syndrome. *Cell* 1998; 93: 467–476.
19. Carney JP, Maser RS, Olivares H i wsp. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen Breakage Syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998; 93: 477–486.
20. Callebaut I, Morron JP. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 1997; 400: 25–30.
21. Hoffman K, Bucher P. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 347–349.
22. Lieber MR. Pathological and physiological double-strand breaks. Roles in cancer, ageing, and the immune system. *Am J Pathol* 1998; 153: 1323–1332.
23. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 142–9.
24. Petrini JHJ. DNA repair '99. The mammalian Mre11 (Rad 50) NBS1 protein complex: integration of functions in the cellular damage response. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1264–9.
25. Zhong Q, Chen C-F, Li S i wsp. Association of BRCA-1 with the hRad 50 Mre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 1999; 285: 737–50.
26. Nelms BE, Maser SE, MacKay JF i wsp. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 1998; 280: 590–592.
27. Antoccia A, Stumm M, Saar K i wsp. Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat* 1999; 75: 583–591.
28. Ito A, Tauchi H, Kobayashi J i wsp. Expression of the full-length NBS1 protein restores normal radiation responses in the cells from the Nijmegen Breakage Syndrome patients. *Biochim Biophys Res Commun* 1999; 265: 716–21.
29. Yamazaki V, Wegner R-D i Kirchgessner CU. Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen Breakage Syndrome cells. *Cancer Res* 1998; 58: 2316–2322.
30. Lavin MF i Khanna KK. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia telangiectasia. *Int Radiat Biol* 1999; 75: 1201–1214.
31. Maser RS, Mosen KJ, Helms BE i wsp. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6087–6096.
32. Lim D-S, Kim S-T, Xu B i wsp. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 2000; 404: 613–617.
33. Wu X, Ranganathan V, Weisman DS i wsp. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 2000; 405: 477–482.
34. Zhao S, Weng Y-C, Yuan S-SF i wsp. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 2000; 405, 473–7.
35. Matsuura K, Balmukhanov T, Tauchi H i wsp. Radiation induction of p53 in cells from Nijmegen Breakage Syndrome is defective but not similar to ataxia-telangiectasia. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 602–607.
36. Featherstone C, Jackson SP. The Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr Biol* 1998; 8: R622–5.
37. Lombard DB, Guarente L. Nijmegen Breakage Syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res* 2000; 60: 2331–2334.
38. Zhu X-D, Kuster B, Mann M i wsp. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genetics* 2000; 25: 347–352.
39. Wu G, Lee WH, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at PML bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells: implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 2000; 275: 30618–22.
40. Berg WJ. The incidence of multiple primary cancers. 1. Development of further cancers in persons with lymphoma, leukemias and myeloma. *J Natl Cancer Inst* 1967; 38: 741–6.
41. Varon R., Reis A, Henze G i wsp. Mutation in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *International Workshop on Nijmegen Breakage Syndrome*. 8–11 June, 2000, Częstochowa.
42. Rowley JD. Chromosome translocations: dangerous liaisons. 1993 Robert R. de Villiers Lecture. *Leukemia* 1994; 8 suppl 1: S1–S6.
43. Sperling K, Varon R, Seemanova E i wsp. Prevalence of the NBS founder mutation and clinical ascertainment of homozygotes. *International Workshop on the Nijmegen Breakage Syndrome*, 8–11 June 2000, Częstochowa.
44. Gatti R, Tward A, Concannon P. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Molec Genet Metab* 1999; 68: 419–23.
45. Swift A, Morell D, Massey RB i wsp. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *New Engl J Med* 1991; 325:1831–1836.
46. Hall J, Angele S. Radiation, DNA damage and cancer. *Molec Med Today* 1999; 5: 157–64.
47. Savitsky K, Bar-Shira A, Giland S i wsp. A single ataxia-telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268: 1749–53.
48. Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene. A continuing debate. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 795–802.
49. Lavin MF, Concannon D, Gatti R. Eight International Workshop on Ataxia-telangiectasia (ATW 8). *Cancer Res* 1999; 59: 3845–9.
50. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia: closer to unravelling the mystery. *Eur J Hum Genet* 1995; 3: 3116–38.
51. Dahlberg W, Little JB. Response of dermal fibroblast cultures from patients with unusually severe responses to radiotherapy and from ataxia-telangiectasia heterozygotes to fractionated radiation. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 785–80.
52. Seemanova E. An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutation Res* 1990; 238: 321–324.
53. Seemanova E, Sperling K, Varon R i wsp. High cancer rate in NBS families. *International Workshop on Nijmegen Breakage Syndrome*. 8–11 June 2000, Częstochowa.
54. Steffen J. Dziedziczne uwarunkowania w zachorowaniach na raka sutka. W: Jaśkiewicz J, Pieńkowski T (red). *Pierwsza Ogólnopolska Konferencja Naukowa – Diagnostyka i Leczenie Raka Piersi*, Warszawa 11–12 marca 1999, streszczenia, Volumes 1999, s 20–21.
55. Varley JM, Evens DGR, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome – a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 1997; 76: 1–14.
56. Lavin MF, Bennet I, Ramsay J i wsp. Identification of a potentially radiosensitive subgroup among patients with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1627–34.
57. Broeks A. Cyt za: Lavin MF, Concannon D, Gatti R – poz. 49.

Przyjęto do druku: 28 sierpnia 2000 r.