# รายงานการวิจัย

(ฉบับสมบูรณ์)

## เรื่อง

# การวิเคราะห์การผ่าเหล่าของยีนกดมะเร็งเต้านม *BRCA1* ในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นมะเร็งรังไข่

# Mutation analysis of the breast cancer suppressor gene *BRCA1* in Thai ovarian cancer patients

หัวหน้าโครงการวิจัย
**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูธร แคนยุกต์**

**ผู้ร่วมโครงการวิจัย**
**รองศาสตราจารย์ ดร. อดิศร รัตนพันธ์**
**รองศาสตราจารย์ พญ. สายบัว ชี้เจริญ**
**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. วิรัช วุฒิภูมิ**

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2548 และ 2549

# บทคัดย่อ

มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่พบมากและเป็นสาเหตุของการตายของสตรีไทย ความผิดปกติทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ มะเร็งรังไข่ที่ถ่ายทอดโดยพันธุกรรมพบได้ประมาณร้อยละ 2-12 ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ทั้งหมดซึ่งมีความสัมพันธ์กับการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* การถ่ายทอดการผ่าเหล่าของยีนนี้ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ในสมาชิกครอบครัวสายตรง ในการศึกษาวิจัยนี้ได้วิเคราะห์การผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* จาก genomic DNA ที่ได้จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ (common epithelial ovarian tumor) ซึ่งยังไม่ได้รับการรักษาด้วยเคมีหรือรังสีบำบัดจำนวน 20 ราย อายุระหว่าง 30-60 ปี ณ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี (ไม่พบการผ่าเหล่าของ *BRCA1* exons) จำนวน 1 ราย ด้วยวิธี polymerase chain reaction-single stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) และยืนยันผลการวิเคราะห์ดังกล่าวด้วยวิธี DNA sequencing จากผลการศึกษาไม่พบการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* ในผู้ป่วยทั้ง 20 ราย สันนิษฐานว่าสาเหตุของการเป็นมะเร็งรังไข่ของผู้ป่วยเหล่านี้อาจเกิดจากความผิดปกติของยีนอื่นที่มิใช่ยีน *BRCA1* หรืออาจเกิดจากความผิดปกติในส่วนของ non-coding sequences ของยีน *BRCA1* ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน BRCA1 ในการทำหน้าที่กดการเกิดมะเร็ง (tumor suppression function)

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ | 2 |
| กิตติกรรมประกาศ | 3 |
| สารบัญ | 4 |
| บทนำ | 5 |
| วิธีวิจัย | 8 |
| ผลการทดลอง | 10 |
| สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | 14 |
| บรรณานุกรม | 14 |

# บทนำ

การเกิดมะเร็งหมายถึงการที่เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโตตามปกติอันเกิดจากการทำงานที่ผิดของโปรตีนหรือเอนไซม์ภายในเซลล์นั้น ความผิดปกติดังกล่าวเป็นผลมาจากความเสียหายของยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนหรือเอนไซม์นั้นๆ ความเสียหายของยีนมีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น การได้รับรังสี การได้รับสารเคมี การได้รับไวรัสบางชนิด ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับยีนเกิดได้หลายรูปแบบ เช่น mismatch, single-strand break, double-strand break, base-damage, sugar-damage, DNA-DNA crosslink, DNA-protein crosslink เป็นต้น ความเสียหายที่เกิดขึ้นหากมีน้อยเซลล์จะสามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอ (cellular DNA repair) ได้ด้วยกลไกที่มีอยู่ภายในเซลล์นั้นๆ แต่ถ้าความเสียหายมีมากเซลล์อาจเข้าสู่สภาวะทำลายตัวเอง (apoptosis) หรืออาจกลายเป็นมะเร็ง (oncogenesis) ในที่สุด

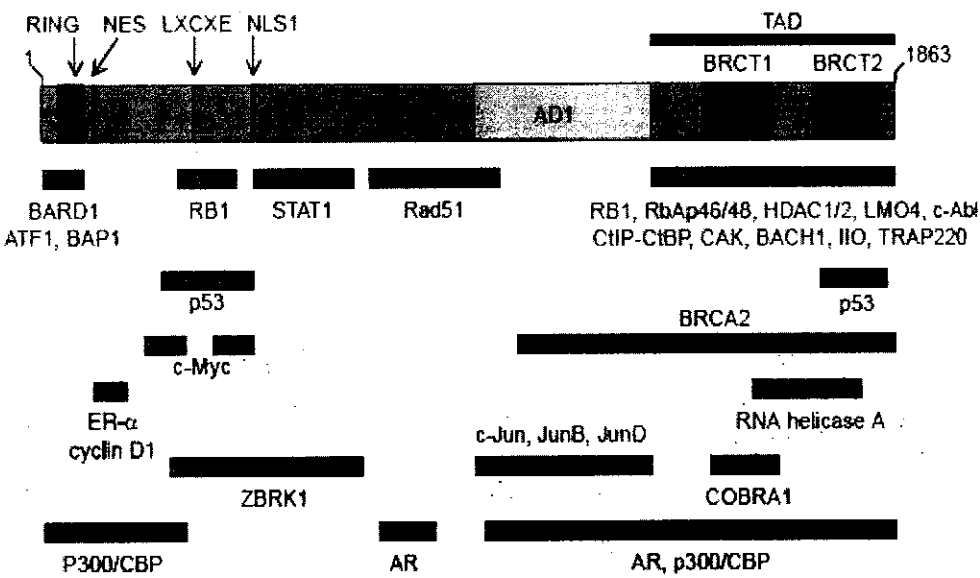
มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในประเทศพัฒนาแล้ว สำหรับในประเทศไทยอุบัติการของโรคค่อนข้างต่ำกว่าประเทศดังกล่าว และเป็นมะเร็งที่พบมากรองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิง (Deerasamee *et al.*, 1999) และอัตราการเกิดมะเร็งรังไข่มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี จากการศึกษาระดับโมเลกุลพบว่าการเกิดมะเร็งรังไข่มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติทางพันธุกรรมและสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้ (familial cancer) มะเร็งรังไข่ที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมนี้มีสาเหตุมาจากการผ่าเหล่า (mutation) ของยีนกดมะเร็งเต้านม *BRCA1* (breast cancer suppressor gene1) ซึ่งจะพบได้ประมาณร้อยละ 2-12 ของการเกิดมะเร็งรังไข่ทั้งหมด การผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* ทำให้การซ่อมแซมดีเอ็นเอและการแบ่งตัวของเซนโตรโซมผิดปกติ เซลล์เจริญเติบโตช้าลง อัตราการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น และในที่สุดก่อให้เกิดมะเร็งได้ (Deng and Scott, 2000) โดยความผิดปกติของยีน BRCA1 มักเกิดร่วมกับความผิดปกติของยีนอื่นๆ เช่น ยีน p53 (Miyoshi *et al.*, 2000) เป็นต้น

ยีน *BRCA1* ประกอบด้วย 24 exon และ 22 intron โปรตีน BRCA1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1863 ตัว (Miki *et al.*,1994) มี 3 domain หลักที่สำคัญดังนี้ (รูปที่ 1)

1. N-terminal ของ BRCA1 ประกอบด้วย RING finger domain (กรดอะมิโนตั้งแต่ลำดับที่ 24-64) ซึ่งมีกรดอะมิโน cysteine และ histidine ยึดจับกับอะตอมสังกะสี กรดอะมิโน 1-109 ของ BRCA1 จะเป็น protease–resistant domain ที่จะจับกับอีกโมเลกุลของ BRCA1 เกิดเป็น homodimer หรือเกิด heterodimer กับโปรตีน BARD1 (Meza *et al.*,1999) และพบว่าบริเวณนี้ยังสามารถจับกับโปรตีน E2F1 (Wang *et al.*,1998) และ BAP1 (BRCA1-associated protein1) (Jensen *et al.*,1998)

2. Exon 11 เป็น exon ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนจะมีสัดส่วนของโปรตีนประมาณร้อยละ 60 ของโปรตีน BRCA1 ทั้งหมด บริเวณนี้ประกอบด้วย nuclear localization signal (NLS) ทำหน้าที่เป็นตัวนำโปรตีนทั้งหมดเข้าสู่นิวเคลียส นอกจากนี้โปรตีนในส่วนของ exon 11 ยังจับกับโปรตีนอื่นๆ เช่น RAD50 (Zhong *et al.*,1999), RAD51 (Scully *et al.*,1997a; Scully *et al.*,1997b), Rb (Aprelikova *et al.*,1999) และ c-Myc (Wang *et al.*,1998) เป็นต้น

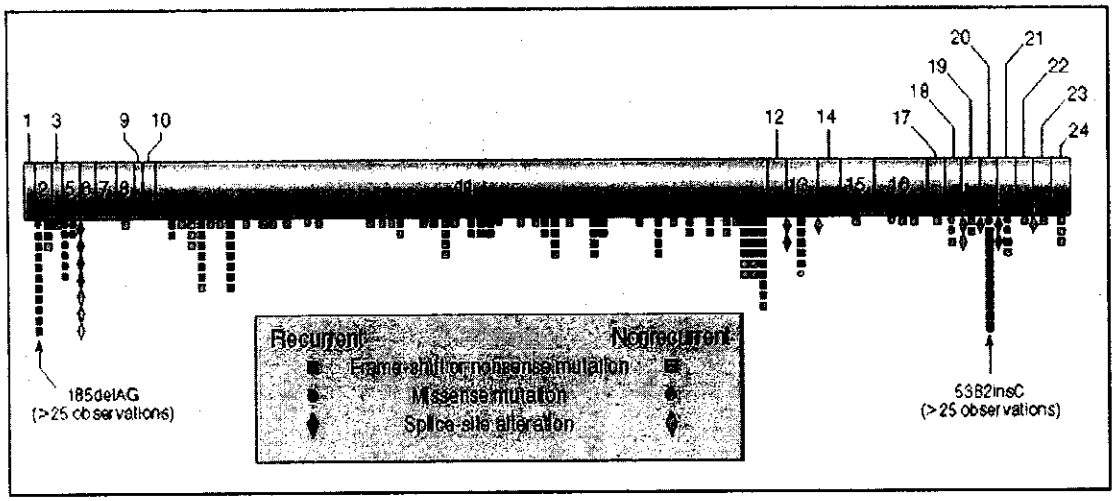
3. C-Terminal ประกอบด้วย BRCT domain (BRCA1 C-terminal domain) 2 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนหลายชนิดเช่น p53 (Ouchi *et al.*,1998; Zhang *et al.*,1998; Chai *et al.*,1999), RNA polymerase II (Scully *et al.*,1997c), RNA helicase A (Anderson *et al.*,1998), p300 และ CBP (CREB binding protein) (Neish *et al.*,1998), BRCA2 (Chen *et al.*,1998), Rb (Yarden and Brody,1999), histone deacetylase complex (Yarden and Brody,1999) และ CtIP (Yu *et al.*,1998)




**รูปที่** 1 บริเวณต่างๆ ของโปรตีน BRCA1 ที่เกิดอันตรกิริยากับโปรตีนอื่นๆ
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Deng and Scott, 2000)

การผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* มักเกิดขึ้นตลอดทั้งยีน ประมาณร้อยละ 60 จะพบที่ exon 11 เนื่องจากเป็น exon ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะของการผ่าเหล่าจะพบทั้งแบบ insertion, deletion ซึ่งอาจมีผลให้เกิดความผิดปกติทั้งแบบ inframe หรือ frameshift ทำให้การแปลรหัสหลัง

ตำแหน่งที่มีการผ่าเหล่าผิดไป รวมทั้งมี stop codon ผิดตำแหน่งคือเกิดขึ้นก่อนตำแหน่งเดิม ตามปกติทำให้ได้โปรตีนที่มีการขาดหายไปของ C-terminal ความผิดปกติแบบนี้พบได้มากถึงร้อยละ 60 นอกจากนี้ยังมีความผิดปกติเฉพาะตำแหน่งของเบสอันทำให้การแปลรหัสผิดไป (missense) หรือเกิดเป็นรหัสหยุด (nonsense) หรืออาจไม่ส่งผลกระทบใดๆ ต่อการแปลรหัส (polymorphism) ความผิดปกติดังกล่าวพบทั้งในบริเวณ exon และ intron ปัจจุบันมีรายงานการผ่าเหล่าทั่วโลกมากกว่า 1,500 แบบ (Breast cancer information core, 2008) (รูปที่ 2)




**รูปที่** 2 ลักษณะและความถี่ของการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1*

ความถี่ของอุบัติการการเกิดการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* ในแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกันโดยสามารถแบ่งกลุ่มตามความถี่และแบบของการผ่าเหล่าที่พบได้ดังนี้

1. กลุ่มความถี่สูง พบในประชากรอเมริกัน ยิว (Ashkenazi Jews) ดัทช์ และอิตาเลียน แบบของการผ่าเหล่าที่พบบ่อย เช่น 185delAG, 5382insC, 2804delAA, 5083del19 เป็นต้น (Montagna *et al.*, 1996; Roa *et al.*, 1996; Peelen *et al.*,1997; Malone *et al.*, 1998)

2. กลุ่มความถี่ปานกลาง พบในประชากรเยอรมัน เวลส์ ไต้หวัน และสแกนดิเนเวียน แบบของการผ่าเหล่าที่พบบ่อย เช่น 5382insC, 4184del4, 2670delC, A5630G, 5234delG เป็นต้น (Jandrig *et al.*, 1996; Hakansson *et al.*, 1997; Lancaster *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999)

3. กลุ่มความถี่ต่ำ พบในประชากรสกอตแลนด์ ญี่ปุ่น จีน และไทย แบบของการผ่าเหล่าที่พบบ่อยเช่น G2508T, C2640T, T4410C, 5846insA, 774ins20 เป็นต้น (Mullen *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1999; Patmasiriwat *et al.*, 2002)

ยีน *BRCA1* ที่ผ่าเหล่าสามารถทำการตรวจกรองได้ทั้งทางคลินิคและทางห้องปฏิบัติการ การตรวจทางคลินิคทำได้โดยตรวจหาการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* จากครอบครัวที่มีประวัติการเป็นมะเร็งรังไข่และ/หรือมะเร็งเต้านม การตรวจกรองยีน *BRCA1* ทางห้องปฏิบัติการเป็นการตรวจหาตำแหน่งที่เกิดการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* โดยอาศัยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ซึ่งวิธีนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง 100% แต่ค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจกรองยีน *BRCA1* เบื้องต้นก่อนที่จะหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ วิธีการตรวจกรองยีนที่นิยมใช้มีหลายวิธี เช่น allele specific oligonucleotide testing (ASO), protein truncation testing (PTT), conformation sensitive gel eletrophoresis (CSGE), single stranded conformation polymorphism (SSCP), heteroduplex analysis และ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) หรือใช้หลายๆ วิธีร่วมกัน ในปัจจุบันได้มีการตรวจกรองหาความผิดปกติของยีน *BRCA1* ในแต่ละเชื้อชาติต่างๆ ทั่วโลก อย่างไรก็ตาม การศึกษาการวิเคราะห์การผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* ในประชากรไทยยังมีน้อยมาก (Patmasiriwat *et al.*, 2002) โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาการผ่าเหล่าของยีนกดมะเร็งเต้านม *BRCA1* ในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นมะเร็งรังไข่

**วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

1. วิเคราะห์หาการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* ในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นมะเร็งรังไข่
2. ศึกษาความถี่ของแบบของการผ่าเหล่าต่างๆ ที่พบในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่

**วิธีวิจัย**

1. **การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียม** genomic DNA

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งรังไข่ (common epithelial ovarian tumor) และยังไม่ได้รับการรักษาด้วยเคมีหรือรังสีบำบัด จำนวน 20 ราย และอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี (ไม่พบ mutation จากการหาลำดับเบสของ 22 *BRCA1* exons) 1 ราย ซึ่งมีอายุระหว่าง 30-60 ปี รายละ 5 มิลลิลิตร ณ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยอยู่ในความดูแลและรับผิดชอบของ รองศาสตราจารย์ พญ.สายบัว ชี้เจริญ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.วิรัช วุฒิภูมิ และทีมงานภาควิชาสูติศาสตร์และนารีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

เตรียม genomic DNA จากเลือดโดยวิธี SDS-proteinase K treatment และหาปริมาณ genomic DNA โดยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี (Sambrook *et al.*, 1989)

2. **การเพิ่มปริมาณ** coding exons (22 exons) **ของยีน** *BRCA1* **จาก** genomic DNA **ด้วยเทคนิค** Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณส่วนของ exon ทั้ง 22 exons ของ genomic DNA โดยการออกแบบ forward primers, reverse primers และ thermal cycles ที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR

3. **การวิเคราะห์** coding exons **ของยีน** *BRCA1* **ด้วยเทคนิค** SSCP

นำ PCR product ของแต่ละ exon ๆ ละ 2 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 3 ไมโครลิตร และ SSCP gel loading buffer (95% Formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, 1 M EDTA และ 1M NaOH) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที นำ PCR product ของแต่ละ exon 10 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่เตรียมไว้ (10% non-denaturing polyacrylamide gel) นำเจลมาใส่ในกล่องพลาสติกใส เติมเมธานอล 40% แล้ววางไว้เป็นเวลา 10 นาที เทเมธานอลทิ้ง เติมกรดไนตริก 160 มิลลิโมลาร์ 50 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 6 นาที ดูดส่วนของกรดไนตริกด้านล่างทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ย้อมเจลด้วย 0.2% Silver Nitrate 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารย้อมเจลทิ้ง ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมสารละลาย developer ($Na_2CO_3$, 37% Formaldehyde ในน้ำ) 50 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 4-10 นาที จนกระทั่งเห็นแถบของดีเอ็นเอ หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซิตริก 10% เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที ทำเจลที่ได้ให้แห้งด้วย Gel Dryer

4. **การตรวจหาลำดับเบสของ** coding exons **ของยีน** *BRCA1*

ตรวจหาลำดับเบสของ coding exons ของยีน BRCA1 ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer) โดยใช้ชุดน้ำยา PRISM™ Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit โดยมีขั้นตอนดังนี้

ผสม Terminator Premix 8 ไมโครลิตร DNA template (0.1-0.2 ไมโครกรัม) และไพรเมอร์ 3.2 พิโคโมล ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายครบ 20 ไมโครลิตร นำไปสารตัวอย่างไปใส่ในเครื่อง PCR นำ PCR product ของแต่ละ exon มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (Promega) เติมส่วนผสมของ deionized formamide, 50 mM EDTA, pH 8.0 และ blue dextrane (5:1) 4 ไมโครลิตร ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แช่หลอดสารตัวอย่างในน้ำแข็งก่อนใส่เข้าเครื่อง Automated ABI 377 DNA Sequencer และตรวจหาลำดับเบสของ coding exons ของยีน BRCA1 จากเครื่องบันทึกผล

## ผลการทดลอง

1. **การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียม** genomic DNA

สกัด genomic DNA จาก whole blood ของผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่จำนวน 20 รายโดยใช้เทคนิค SDS-proteinase K treatment วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่** 1 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ genomic DNA ที่สกัดได้ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่

| ผู้ป่วย | อายุ | $OD_{260}$ | $OD_{280}$ | $OD_{260}/OD_{280}$ | DNA concentration (ng/μL) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 46 | 0.271 | 0.152 | 1.78 | 1355 |
| 2 | 59 | 0.104 | 0.057 | 1.82 | 520 |
| 3 | 50 | 0.116 | 0.062 | 1.87 | 580 |
| 4 | 46 | 0.034 | 0.019 | 1.79 | 170 |
| 5 | 54 | 0.210 | 0.119 | 1.76 | 1050 |
| 6 | 53 | 0.193 | 0.106 | 1.82 | 965 |
| 7 | 54 | 0.179 | 0.100 | 1.79 | 895 |
| 8 | 50 | 0.658 | 0.368 | 1.78 | 3290 |
| 9 | 60 | 0.297 | 0.164 | 1.81 | 1485 |
| 10 | 39 | 0.506 | 0.275 | 1.84 | 2530 |
| 12 | 58 | 0.464 | 0.253 | 1.83 | 2320 |
| 13 | 53 | 0.340 | 0.185 | 1.84 | 1700 |
| 14 | 44 | 0.435 | 0.235 | 1.85 | 2175 |
| 15 | 46 | 0.186 | 0.102 | 1.82 | 930 |
| 16 | 52 | 0.333 | 0.186 | 1.79 | 1665 |
| 17 | 55 | 0.025 | 0.014 | 1.78 | 125 |
| 18 | 46 | 0.119 | 0.064 | 1.86 | 595 |
| 19 | 37 | 0.054 | 0.030 | 1.80 | 270 |
| 20 | 50 | 0.162 | 0.089 | 1.82 | 810 |

2. **สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ**

ทำการทดลองในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณ *BRCA1* exons (exon 2- 24 ยกเว้น exon 4) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีอุณหภูมิเริ่มต้นของ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ annealing (ตารางที่ 2) เป็นเวลา 45 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยตั้งโปรแกรมสำหรับทำ PCR จำนวน 30 รอบ

**ตารางที่** 2 Oligodeoxyribonucleotide primers, magnesium chloride, annealing temperature ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

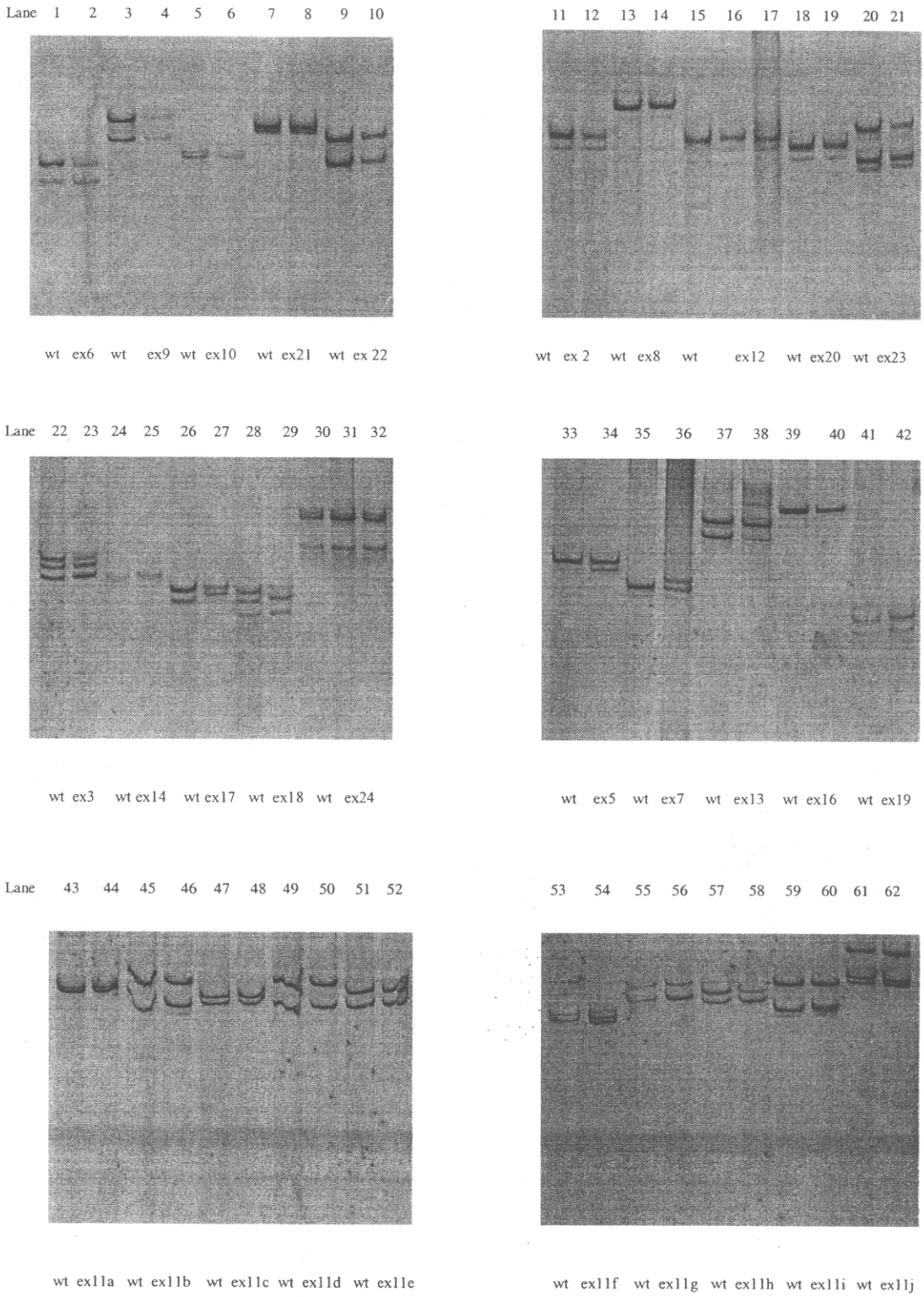
| Exon | Forward primer | Reverse primer | $MgCl_2$ (mM) | Tm (°C) | Size of product (bp) |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | GAAGTTGTCATTTTATAAACC | TCTGTTCATTTGCATAGGAG | 1.5 | 55 | 227 |
| 3 | GTTGACTCAGTCATAACAGCTC | GGAGTTGGATTTTTCGTTCTC | 1.5 | 60 | 293 |
| 5 | TCTTTTCATGGCTATTTGCC | CCTGTATAAGGCAGATGTCCC | 1.5 | 60 | 350 |
| 6 | GGTTGATAATCACTTTGCTGAG | CTATGACGTGGTGATAAAGAC | 1.5 | 57 | 174 |
| 7 | GAGCATACATAGGGTTTCTC | GAAGAAGAAGAAGAAAACAAA | 1.5 | 56 | 260 |
| 8 | CTGGCCAATAATTGCTTGAC | CTTCCAAAGCTGCCTACCAC | 1.5 | 60 | 261 |
| 9 | TACCTGCCACAGTAGATGCTC | CCAGCTTCATAGACAAAGG | 1.5 | 58 | 206 |
| 10 | CAGTTCTGCATACATGTGGC | CCCATCTCTCTTTTCAGTGCCTG | 1.5 | 59 | 181 |
| 11A | GCCAGTTGGTTGATTTCCACC | CTTTACTCCCAGCCCATCTG | 1.5 | 60 | 404 |
| 11B | CATTACAGCATGAGAACAGCAG | GCATTTGATTCAGACTCCCC | 1.5 | 60 | 376 |
| 11C | GTTAGGTTCTGATGACTCACATG | GTCTTTTGAACTGCCAAATCTGC | 1.5 | 60 | 408 |
| 11D | GCGTAAAAGGAGACCTACATCAG | GGTGGGCTTAGATTTCTACTGAC | 1.5 | 60 | 393 |
| 11E | CTGAGGAAGAAGTCTTCTACC A | GGGTCTTCAGCATTATTAGACAC | 1.5 | 60 | 410 |
| 11F | CCCAATGGATACTTAAGCCTTC | CCCAATGGATACTTAAAGCCTTC | 1.5 | 60 | 405 |
| 11G | GGGACTAATTCATGGTTGTTC C | CCTAGAGCCTCCTTTGATACTAC | 1.5 | 60 | 418 |
| 11H | GTAGTATCAAAGGAGGCTCTAGG | GTTGCAAAACCCCTAATCTAAGC | 1.5 | 60 | 441 |
| 11I | GGGCCAAAATTCAATGCTATGC | CTAAATTCTTGGCCCCTCTTCG | 1.5 | 60 | 400 |
| 11J | GAAGAGCTTCCCTGCTTCCA | GTAAAATGTGCTCCCCAAAAGC | 1.5 | 60 | 520 |
| 12 | CCAGTCCTGCCAATGAGAAG | CCACACACACGCATGTGCAC | 1.5 | 61 | 218 |
| 13 | CTTGTAGTTTCCATACTAGGTG | GGTCCTTACTCTTCAGAAGG | 1.5 | 58 | 376 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 14 | CAGTATTCTAACCTGAATTATCAC | GATGTCAGATACCACAGCATC | 1.5 | 58 | 242 |
| 15 | CACAATGGCGATGG | CTTTATGTAGGATTCAGAG | 1.5 | 54 | 297 |
| 16 | CCAACACTGTATTCATGTACC C | GTCATTAGGGAGATACATATGG | 1.5 | 61 | 453 |
| 17 | CTGAGCTGTGTGCTAGAG | TCGGCCTCCCAAAGTGCTGC | 1.5 | 61 | 247 |
| 18 | GCTTCTTAGGACAGCACTTCC | CTCAGACTCAGCATCAGC | 1.5 | 59 | 233 |
| 19 | GTGAATCGCTGACCTCTC | ATGAGCCACAGTGCAGGCCTGC | 1.5 | 62 | 286 |
| 20 | GACGTGTCTGCTCCACTTCC | TACAGAGTGGTGGGGTGAG | 1.5 | 61 | 210 |
| 21 | CTCTCCAATTCCCCTGTCCCTC | GCAATCTGAGGAACCCCCATC | 1.5 | 63 | 196 |
| 22 | GAGGGCCTGGGTTAAGTATGC | TGTGTCCTCCCTCTCTGACTG | 1.5 | 63 | 173 |
| 23 | ATGAAGTGACAGTTCCAGTAG | CTCAAGCACCAGGTAATGAG | 1.5 | 61 | 292 |
| 24 | GAACTCATACAACCAGGA CCC | ACTTTGTAAGCTCATTCTTG | 1.5 | 58 | 267 |

3. **การวิเคราะห์** *BRCA1* **exons ด้วยเทคนิค** SSCP **และ** DNA sequencing

นำ PCR products ของแต่ละ *BRCA1* exons (22 exons) ที่ผ่านการเตรียมเป็นดีเอ็นสายเดี่ยวแล้วมาวิเคราะห์ด้วย 10% non-denaturing polyacrylamide gel แล้วย้อมเจลด้วย silver staining โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับ wild-type *BRCA1* exons ของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี (ไม่พบ mutation จากการหาลำดับเบสของแต่ละ *BRCA1* exon) ลักษณะ electrophoretic mobility ของ normal/wild-type *BRCA1* exons เมื่อเปรียบเทียบกับ *BRCA1* exons ของ patient #1 บน 10% non-denaturing polyacrylamide gel และย้อมเจลด้วย silver staining แสดงในรูปที่ 3

จากผลการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนเจลของแต่ละ exon ที่ได้จากผู้ป่วยในแต่ละราย พบว่าการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลไม่แตกต่างไปจากการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี และเมื่อได้วิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน *BRCA1* ในแต่ละ exon ดังกล่าว พบว่าไม่มีความผิดปกติของยีน *BRCA1* ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ทั้ง 20 ราย ซึ่งเป็นการยืนยันผลในขั้นสุดท้ายว่าผู้ป่วยในแต่ละรายมียีน *BRCA1* ที่ปกติ




**รูปที่** 3 ภาพแสดง electrophoretic mobility ของ wild-type *BRCA1* exons เปรียบเทียบกับ *BRCA1* exons ของ patient #1 บน 10% non-denaturing polyacrylamide gel และย้อมเจลด้วย silver staining (wt คือ normal/wild-type *BRCA1* exons ของ control person, ex คือ exon ของ patient #1)

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์หาความผิดปกติของยีนกดมะเร็งเต้านม *BRCA1* ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่จำนวน 20 รายที่มีอายุระหว่าง 30-60 ปี และยังไม่ได้รับการรักษาด้วยเคมีหรือรังสีบำบัด ณ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

จากผลการวิจัยไม่พบความผิดปกติของยีน *BRCA1* ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ทั้ง 20 ราย สันนิษฐานว่าสาเหตุของการเป็นมะเร็งรังไข่ของผู้ป่วยดังกล่าวอาจมีหลายสาเหตุ เช่น เกิดความผิดปกติของยีนอื่นที่มิใช่ยีน *BRCA1* หรือเกิดความผิดปกติในส่วนของ non-coding sequences (introns) ของยีน *BRCA1* ซึ่งอาจส่งผลต่อโครงสร้างและการทำงานของยีน *BRCA1* หรือเกิดจาก methylation ของ CpG island ซึ่งเป็น regulatory region ของยีนนี้ พบว่า 5′ regulatory region ของ *BRCA1* จะไม่ใช่ TATA แต่ประกอบด้วย cytosine-guanine ประมาณ 56% (Rice *et al.*, 1998) ในเซลล์ปกติ CpG ของ *BRCA1* จะไม่เกิด methylation แต่ใน sporadic breast and ovarian cancer จะพบ methylation ของ CpG รอบๆ transcriptional start site ทำให้การถอดรหัสลดลง (Mancini *et al.*, 1998) และพบว่า methylation ของยีน *BRCA1* เป็นสาเหตุของการเกิด sporadic ovarian cancer ประมาณ 15% (Baldwin *et al.*, 2000)

อย่างไรก็ดีการศึกษาวิจัยครั้งนี้น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่เป็นประโยชน์ในการคัดกรองความผิดปกติของยีน *BRCA1* ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ โดยเฉพาะการคัดกรองยีนในสมาชิกของครอบครัวที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งรังไข่ รวมทั้งการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม (genetic counseling) ในกลุ่มประชากรไทยที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งรังไข่ในอนาคต และคาดว่าผลการวิจัยครั้งนี้น่าจะเป็นประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่ทำวิจัยเกี่ยวข้องมะเร็งวิทยาระดับโมเลกุล

## บรรณานุกรม


Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Nakajima, T., Wolpin, E.S. and Parvin, J.D.1998. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. Nature Genet. 19: 254-256.

Aprelikova, O.N., Fang, B.S., Meissner, E.G., Cotter, S., Compbell, M., Kuthiala, A., *et al.* 1999. BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11866-11871.

Balwin, R.L., Nemeth, E., Tran, H., Shvartsman, H., Cass, I., Narod, S., *et al.*, 2000. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: A population based study. Cancer Res. 60: 5329-5333.

Baudi, F., Quaresima, B., Grandinetti, C., Cuda, G., Faniello, C., Tassone, P., *et al.* 2001. Evidence of a founder mutation of BRCA1 in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer. Hum. Mutat. 18: 163-164.

Berry, D.A., Parmigiani, G., Sanchez J., Schildkraut, J. and Winer, E. 1997. Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history, J. Natl. Can. Inst. 89: 227-238.

Borg, A., Dorum, A., Heimdal, K., Maehle, L., Hoving, E. and Moller, P. 1999. BRCA1 1675delA and 1135insA account for one third of Norwegian familial breast-ovarian cancer and are associated with later disease onset than less frequent mutation. Disease Marker 15: 79-84.

Breast Cancer Information Core.2008.*http://www.nhgri.nih.gov*

Burke, W., Daly, M., Botkin, J., Kahn, M.J., Lynch, P., *et al.* 1997. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2.Cancer Genetics Studied Consortium. JAMA. 277: 997-1003.

Chai, Y.L., Cui, J., Shao, N., Shyam, E., Reddy, P. and Rao, V.N. 1999. The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. Oncogene 18: 263-268.

Chapman, M.S., and Verma, I.M. 1996. Transcriptional activation by BRCA1. Nature 382 : 678-379.

Chen, Y., Lee, W.H. and Chew, H.K. 1999. Emerging Role of BRCA1 in Transcriptional Regulation and DNA Repair, J. cell. Physiol. 191: 385-395.

Couch, F.J. and Hartmann, L.C. 1998. BRCA1 testing: advances and retreats. JAMA 279 : 955-957.

Deerasamee, S., Martin, N., Sontipong, S., Sriamporn, S., Sriplung, H., Srivatanakul, P., *et al.* 1999. Cancer in Thailand, volume II, 1992-1994, IARC Technical Report No. 34, Lyon 1999.

Deng, C.X. and Scott, F. 2000. Role of the tumor suppressor gene *Brca1* in genetic stability and mammary gland tumor formation. Oncogene 19: 1059-1064.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P. 1995. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. Cell 82: 675-684.

Dorum̃, A., Heimdal, K., Hoving, E., Inganas, M. and Moller, P. 1999. Penetrances of BRCA1 1675delA and 1135insA with respect to breast cancer and ovarian cancer. Am. J. Hum. Genet. 65: 671-679.

Elit, L., Jack, E., Kwan, E., Baigal, G. and Narod, S. 2001. A unique BRCA1 mutation identified in Mongolia. Int. J. Gynecol. Cancer. 11: 241-243.

Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochan, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Be., *et al.* 1994. *BRCA1* mutations in primary breast and ovarian carcinomas. Science 266: 120-122.

Gayther, S.A., Harrington, P., Russell, P., Kharkevich, G., Garkavtseva, R.F. and Ponder, B.A.J. 1997. Fequently occurring germline mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia. Am. J. Hum. Genet. 58: 451-456.

Gayther, S.A., Warren, W., Mazoyer, S., Russell, P., Harrington, P.A., Chiano, M., *et al.* 1995. Germline mutation of BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. Nat. Genet. 11 : 428-433.

Ghaderi, A., Talei, A., Farjadian, S ., Mosalaei, M., Doroudchi, M. and Kimura, H. 2001. Germline BRCA1 mutations in Iranian woman with breast cancer. Cancer letters. 165: 87-94.

Goelen, G., Teugels, E., Bonduelle, M., Neyns, B. and De Greve, J. 1999. High frequency of BRCA1/2 germline mutations in 42 Belgian families with a small number of symptomatic subjects. J. Med. Genet. 36: 304-308.

Gorski, B., Byrski, T., Huzarski, T., Jakuboska, A., Menkiszak, J., Gronwald, J., *et al.* 2000. Founder mutations in the BRCA1 gene polish families with breast-ovarian cancer. Am. J. Hum. Genet. 66: 1963-1968.

Hakansson, S., Johannsson, O., Johannsson, U., Sellberg, G., Loman, N., Gerdes, A. M., *et al.* 1997. Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Scandinavian familial breast cancer. Am. J. Hun. Genet. 60: 1068-1078.

Ho, G.H., Phang, B.H., Ng, I.S.L., Law, H.Y., Soo, K.C., Ng, E.H., *et al.* 2000. Novel germline BRCA1 mutations detected in women in Singapore who developed breast carcinoma before the age of 36 years. Cancer 89: 811-816.

Hodgson, S.V., Heap, E., Cameron, J., Ellis, D., Mathew, C.G., Eeles, R.A., *et al.* 1999. Risk factors for detecting germline BRCA1 and BRCA2 founder mutations in Ashkenazi Jewish woman with breast or ovarian cancer. J. Med. Genet. 36: 369-373.

Ikeda, N., Miyoshi, Y., Yoneda, K., Shiba, E., Sekihara, Y., Kinoshita, M., *et al.* 2001. Frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese breast cancer families. Int. J. Cancer. 91: 83-88.

Jandrig, B., Grade, K., Seitz, S., Waindzoch, B., Muller, M., Bender, E., *et al.* 1996. BRCA1 methylations in German breast cancer families. Int. J. Cancer. 68: 188-192.

Janezic, S.A., Ziogas, A., Krumroy, L.M., Krasner, M., Plummer, S.J., Cohen, P., et al. 1999. Germline BRCA1 alterations in a population-based series of ovarian cancer cases. Hum. Mol. Genet. 8: 889-897.

Johannsson, O., Ostermeyer, E.A., Hakannsson, S., Friedman, L.S., Johansson, U., Sellberg, G., *et al.* 1996. Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden. Am. J. Hum. Genet. 58: 441-450.

Lancaster, J. M., Carney, M. E., Gray, J., Myring, J., Gumbs, C., Samson, J., *et al.* 1998. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families from Wales: moderate mutation frequency and two recurrent mutation in BRCA1. Br. J. Cancer. 78: 1417-1420.

Li, S., Chen, P., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomilson, G., Osborne, C k., Sharp, Z.D. and Lee, W.H. 1999. Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. J. Biol. Chem. 274: 11334-11338.

Liede, A., Cohen, B., Black, D.M., Davidson, R.H., Renwick, A., Hoodfar. E., *et al.* 2000. Evidence of founder BRCA1 mutation in Scotland. Br. J. Cancer. 82: 705-711.

Malone, K.E., Daling, J.R., Thompson, J.D., O'Brien, C.A., Francisco, L.V. and Ostrander, J.R. 1998. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population : analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. JAMA 279: 922-929.

Mancini, D.N., Rodenhiser, D.I., Ainsworth, P.J., O'Malley, F.P., Singh, S.M., Xing, W., *et al.*, 1998. CpG methylation within the 5′ regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. Oncogene. 16: 1161-1169.

Meza, J.E., Brzovic, P.S., King, M.C., and Klevit, R.E. 1999. Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. J. Biol. Chem. 274: 5659-5665.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, 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.

Miyaki, T., Hu, Y.F., Yu, D.S. and Li, R. 2000. A functional comparison of BRCA1 C-terminal domains in transcription activation and chromatin remodeling. J. Biol. Chem. 275: 40169-40173.

Miyoshi, Y., Iwao, K., Takahashi, Y., Egawa, C. and Noguchi, S. 2000. Acceleration of chromosomal instability by loss of BRCA1 expression and p53 abnormality in sporadic breast cancers. Cancer Letter 159: 211-216.

Montagna, M., Santacatterina, M., Corneo, B., Menin, C., Serova, O., Lenoir, G. M., *et al.* 1996. Identification of seven new BRCA1 germline mutation in Italian breast cancer and breast/ovarian cancer families. Cancer Res. 56: 5466-5469.

Monteiro, A.N., August, A. and Hanafusa, H. 1996. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13595-13599.

Mullen, P., miller, W. R., Mackay, J., Fitzpatrick, D. R., langdon, S. P., and Warner, J. P. 1997. BRCA1 5382insC mutation in sporadic and familial breast and ovarian cancer in Scotland. Br. J. Cancer. 75: 1377-1380.

Narod, S.A., Ford, D., Devilee, P. and Barkardottir, R.B. 1995. Valuation of genetic heterogeneity in 14M. An breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Linkage Consortium. Am. J. Hum. Genet. 56: 254-264.

Neish, A.S., Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Wei, W. and Parvin, J.D. 1998. Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. Nucleic Acids Res. 26: 847-853.

Newman, B., Mu, H., Butler, L.M., Milikan, R.C., Moorman, P.G. and King, M.C. 1998. Frequency of breast cancer institutable to BRCA1 in a population-based sereis of American woman. JAMA 279: 915-921.

Ouchi, T., Monteiro, A.N., August, A., Aaronson, S.A. and Hanafusa, H. 1998. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 2303-2306.

Patmasiriwat, P., Bhothisuwan, K., Jerareungrattana, A., Sinilnikova, O., Goldgar, D., Saunders, G.F., *et al.* 2000. Novel BRCA1 and BRCA2 mutations in familial Thai breast and/or ovarian cancers. Mahidol University Annual Research Abstract. p.34.

Peelan, T., Van Vliet, M., Petrij-Bosch, A., Mieremet, R., Szobo, C., Van den Ouweland, A.M.W., *et al.* 1997. A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. Am. J. Hum. Genet. 60: 1041-1049.

Rice, J.C., Massey-Brown, K.S. and Futscher, B.W. 1998. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. Oncogene 17:1807-1812.

Roa, B.B., Boyd, A.A., Volcik, K. and Richards, C.S. 1996. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nature Genet. 14: 185-187.

Rodiquez, J.A and Henderson, B.R. 2000. Identification of a functional Nuclear Export Sequence in BRCA1. J. Biol. Chem. 275: 38589-38596.

Ruffner, H. and Verma, I.M. 1997. BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phospho-protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7138-7143.

สำนักหอสมุดการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., Livingston, D.M., *et al.* 1997. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. Cell 88: 265-275.

Scully, R.C., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D.M. 1997. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. Cell 90: 425-436.

Scully, R., Anderson, S.F., Chao, D.M., Wei, W., Yen/kg, L., Young, R.A., *et al.* 1997. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5605-5610.

Shattuck-Eidens, D., McClure, M., Simard, J., Labrie, F., Narod, S., Couch, F., *et al.* 1995. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. JAMA 273: 535-541.

Shattuck-Eidens, D., Oliphant, A., McClure, M., McBride, C., Gupte, J., *et al.* 1997. BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations : risk factor analysis and implications for genetic testing. JAMA 278: 1242-1250.

Shen, S.X., Weaver, Z., Xu, X., Li, C., Weinstein, W., Guan, X.Y., *et al.* 1998. A targeted disruption of the murine *Brca1* gene causes γ-radiation hypersensitivity and genetic instability. Oncogene 17: 3115-3124.

Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y.X., Houvras, Y., Peng, Y., Zhang, H., *et al.* 1997. Arrest of the cell cycle by the tumor-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. Nature 389: 187-190.

Strachan, T. and Read, A.P. 1999. Human Molecular Genetics. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford. UK.

Tang. N.L., Pang, C.P., Yeo, W., Choy, K.W., Lam, P.K., Suen. M., *et al.* 1999. Prevalence of mutations in the BRCA1 gene among Chinese patients with breast cancer. J. Natl. Cancer. Inst. 91: 882-885.

Tonin, P.N., Mes-Masson, A.M., Futrel, P.A., Morgan, K., Mahon, M., Foulkes, W.D., *et al.* 1998. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families. Am. J. Hum. Genet. 63: 1341-1351.

Wagner, T.M.U., Moslinger, R.A., Muhr, D., Langbauer, G., hirtenlehner, K., Concin, H., *et al.* 1998. BRCA1-related breast cancer in Australian breast and ovarian

cancer families: Specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. Int. J. Cancer. 77: 354-360.

Wagner, T., Stopp-Lyonnet, D., Fleishmann, E., Muhr, D., Pages, S., Sandberg,T., *et al.* 1999. Denaturing high-performance liquid chromatography reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. Genomics 62: 36-76.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., *et al.* 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. Nature 378: 789-792.

Yarden, R.I. and Brody, L.C. 1999. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4983-4988.

Yu, X., Wu, L.C., Bowcock, A.M., Aronheim, A. and Baer, R. 1998. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. J. Biol. Chem. 273: 25388-25392.

Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., *et al.* 1998. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. Oncogene 16: 1713-1721.

Zhong, Q., Chen, C.F., Li, S., Chen, Y., Wang, C.C., Xiao, J., *et al.* 1999. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. Science 285: 747-750.