

HUS1- ja hCAS- geenien eri alleelien yhteys rintasyöpään

Pro Gradu-tutkielma
Itä-Suomen Yliopisto,
Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta,
Kliinisen lääketieteen yksikkö
Riikka Nivajärvi
joulukuu 2012

PRO GRADU- TUTKIELMA

Paikka: ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO
Tekijä: NIVAJÄRVI, RIIKKA LIISA
Otsikko: *HUS1*- ja *hCAS*- geenien eri alleelien yhteys rintasyöpään
Sivumäärä: 75
Ohjaajat: Professori Mikko Lammi, FT Jaana Hartikainen, Dosentti Arto Mannermaa
Tarkastajat: Professori Mikko Lammi, Dosentti Arto Mannermaa
Aika: joulukuu 2012

TIIVISTELMÄ

Rintasyöpä on teollistuneissa maissa naisten yleisin syöpä. Suomessa jopa joka yhdeksäs nainen sairastuu rintasyöpään. (Suomen Syöpärekisteri, 2011). Rintasyövän kehittymiseen vaikuttavat monet tekijät, kuten ikä, vaihdevuosisien jälkeinen ylipaino, tupakointi ja alkoholin suurkulutus sekä ionisoiva säteily ja karsinogeenit (Trichopoulos ym., 1972, MacMahon ym., 1982, Garfinkel ym., 1988, Howe & McLaughlin 1996, Smith-Warner ym., 1998, Preston ym., 2002, Huovinen & Mustajoki, 2007, Suzuki ym. 2009, Suomen Syöpärekisteri, 2011). Lisäksi rintasyöpäriskin suuruuteen vaikuttavat perinnölliset tekijät (Claus ym., 1996). Perinnölliseen riskiin liittyen on löydetty geenejä (*BRCA1* ja *BRCA2*), jotka lisäävät rintasyöpään sairastumisriskiä (Hall ym., 1990, Miki ym., 1994, Wooster ym., 1994, Wooster ym., 1995). Lisäksi on löydetty myös geenejä, jotka on liitetty kohtalaiseen rintasyöpäriskiin (*ATM*, *BRIP1*, *PALB2*, *CHEK2*) (Pharoah ym., 2008) sekä matalan riskin geenejä, jotka aiheuttavat yhdessä muiden matalan riskin geenien ja ympäristötekijöiden kanssa rintasyöpää (Lichtenstein ym., 2000, Pharoah ym., 2002). Tällä hetkellä tunnetut geneettiset tekijät, mukaan lukien korkean riskin aiheuttavat geenit, selittävät alle 30 % rintasyövän geneettisestä riskistä (Fletcher & Houlston, 2010, Zhang ym., 2011). Lisätutkimuksia tarvitaan, koska geneettiseen riskiin liittyviä tekijöitä lienee vielä tunnistamatta.

Tässä Pro Gradu -tutkimuksessa haluttiin selvittää liittyvätkö *hCSEIL/CAS*- ja *HUS1*-geenien polymorfismit rintasyöpäriskiin. Polymorfismien (single nucleotide polymorphism, SNP) genotyypit määritettiin RT-PCR TaqMan-menetelmällä ja yhteyttä rintasyöpäriskiin tutkittiin vertailemalla genotyypifrekvenssejä rintasyöpäpotilaiden ja verrokkihenkilöiden välillä käyttäen tilastollisia menetelmiä. Rintasyöpää sairastavilta tutkittiin myös genotyypin ja kliinispatologisten tekijöiden yhteyttä χ^2 -testillä.

Tutkimuksessa löydettiin *HUS1*-geenin polymorfismeilla rs1056663 (p-arvo 0,005) sekä rs2242479 (p-arvo 0,011) yhteys rintasyöpäriskiin. *HUS1*-geenin polymorfismeilla rs1056663, rs2242479 sekä rs3176564 huomattiin olevan yhteys HER2:een (p-arvot järjestyksessä: p=0,005, p=0,002, p=0,001). *HUS1*-geenin polymorfismilla rs3176582 (p=0,049) ja *CSEIL*-geenin polymorfismeilla rs8118101 (p=0,045) sekä rs8118101 (p-arvo=0,049) huomattiin olevan yhteys levinneisyysasteeseen. Mutta sitä miten *HUS1*-geeni vaikuttaa rintasyöpäriskiin, ei tiedetä tämän tutkimuksen perusteella. *CSEIL*-geenillä ei huomattu olevan yhteyttä rintasyöpäriskiin. On mahdollista että, HER2-positiivisia näytteitä oli testeissä liian vähän luotettavan tuloksen saamiseksi. Myös levinneisyysaste määrittelyksissä harvinaista alleelia oli vähän, jolloin tulosten luotettavuus saattaa kärsiä, ja näin ollen ei tiedetä onko *CSEIL*-geenin polymorfismien yhteys levinneisyysasteeseen oikea.

Esipuhe

Tämä Pro Gradu -työ on jakautunut ajallisesti eri kokonaisuuksiin, joista tärkeimmät ovat olleet kliininen vaihe laboratoriossa sekä kirjoittamisjaksot. Kirjoittamisjaksot ovat jakautuneet usealle vuodelle erinäisten henkilökohtaisten tapahtumien vuoksi, jolloin ei ole jaksanut ajatella ollenkaan tämän työn kirjoittamista, mutta kuten sanonta kuuluu: vaikeuksien kautta voittoon. Tässä tämä työ nyt on valmiina monta vuotta aloittamisen jälkeen.

Haluaisin kiittää kaikkia, jotka ovat olleet tukemassa minua tässä Pro Gradu -työn tekemisvaiheessa. Erityiset kiitokset ohjaajilleni Marialle, Jaanalle ja Artolle, sekä Mikolle, joka loppuvaiheessa tuli Marian tilalle. Lisäksi haluaisin kiittää koko patologian laitoksen henkilökuntaa arvokkaista tiedoista ja avusta työn tekemisen aikana, erityisesti haluaisin kiittää Eijaa laboratorion käyttöön liittyvien asioiden neuvomisessa. Haluaisin kiittää myös Catarinaa vertaistuesta työn kliinisen vaiheen aikana sekä kirjoittamisprosessin alkuvaiheen hankaluuksien selvittelyssä. Erityiset kiitokset haluan osoittaa perheelleni; Viljamille, lapsilleni, vanhemmilleni sekä kaikille ystäväilleni, jotka ovat tukeneet ja kannustaneet minua koko prosessin ajan ja jaksaneet vakuutella työn valmistumisen puolesta.

Lyhenneluettelo

A-T	Ataxia-telangiectasia
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated, ataksia-telangiectasia mutatoitunut
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, ataksia telangiectasiaan ja Rad3:een liittyvä proteiini
BAX	Bcl-2-associated X protein, Bcl-2:een liittyvä proteiini X
BMI	Body mass index, painoindeksi
BRCA1	Breast cancer 1, rintasyöpä 1
BRCA2	Breast cancer 2, rintasyöpä 2
BRIP1	BRCA1-interacting protein 1 gene, BRCA1:n kanssa vuorovaikuttava geeni 1
CASP8	Caspase 8, kaspasi 8
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid, komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo
CHEK2	Check point kinase 2, tarkastuspiste kinaasi 2
CHK1	Checkpoint kinase 1, tarkastuspiste kinaasi 1
c-MYC	c-myelocytomatosis oncogene, c-myelosytomatoosi onkogeeni
COX11	Cytochrome C assembly protein 11, sytokromi C:n kokoava proteiini 11
CS	Cowden syndrome, Cowdenin syndrooma
Cse1	Chromosome segregation protein 1, kromosomien erottelu proteiini 1
CSE1L	Chromosome segregation 1-like, kromosomien segregatio 1 kaltainen
DCIS	Ductal carcinoma <i>in situ</i> , duktaalinen karsinooma <i>in situ</i>
DNA	Deoksiribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo
DSS1	Deleted in Split hand/Split foot protein 1, poistettu halkaistu käsi/halkaistu jalka proteiini
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, etyleenidiamiinitetraetikkahappo
ER	Estrogen reseptori, estrogeeni reseptori
ESR1	<i>Estrogen receptor 1, estrogeeni reseptori 1</i>
FA	Fanconi anemia
FAM	6-Carboxy-fluorescein, 6-karboksifluoreskeiini
FAM84B	Family with sequence similarity 84, member B, perhe, jolla on samankaltainen sekvenssi 84, jäsen B
FA-N	Fanconi anemia N-subtype, Fanconi anemia N-alatyyppe
FANC J	Fanconi anemia J-subtype, Fanconi anemia J-alatyyppe
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2, fibroblasti-kasvutekijän reseptori 2
FGFR10	Fibroblast growth factor reseptori 10, fibroblasti-kasvutekijän reseptori 10
H19	Histone 19, histoni 19
Hep 62	Hepatitis 62, hepatiitti 62
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2, ihmisen epidermaalisen kasvutekijän reseptori 2
HT-29	Human colon adenocarcinoma grade II cell line, ihmisen suolen adenokarsinooman erilaistumisasteen II solulinja

htSNP	Haplotype tagging single nucleotide polymorfism, haplotyyppiä ilmentävä yhden nukleotidin polymorfismi
<i>HUS1</i>	Hydroxy urea sensitive 1, hydroksiureasensitiivinen 1
IGFBP2	Insulin-like growth factor binding protein 2, insuliinin kaltaiseen kasvutekijään sitoutuva proteiini 2
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5, insuliinin kaltaiseen kasvutekijään sitoutuva proteiini 5
Ki-67	Antigeeni Ki-67
kDA	kilodalton
LCIS	Lobular carcinoma <i>in situ</i> , liuskaan rajoittunut karsinooma <i>in situ</i>
LFS	Li-Fraumeni syndrome, Li-Fraumeni syndrooma
LHRH	Luteinising hormone releasing hormone, Luteinisoivaa hormonia vapauttava hormoni
<i>LKB1</i>	Serine-threonine protein kinase 11, seriini-treoniini proteiinikinaasi 11
LSP1	Lymphocyte-specific protein 1, lymfosyyttispesifinen proteiini 1
<i>MAP3K1</i>	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1, mitogeenin aktivoima proteiini kinaasi kinaasi kinaasi 1
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 cell line, Michigan syöpäsäitiö-7 -solulinja
<i>MIER3</i>	Mesoderm induction early response 1, family member 3, mesodermin induction aikainen vaste 1, perheenjäsen 3
MMP2	Matrix metalloproteinase-2, soluväliaineen metalloproteinaasi-2
MMix	Mastermix
<i>MRPS30</i>	Mitochondrial ribosomal protein S30, mitokondriaalinen ribosomaalinen proteiini 30
<i>NEK10</i>	Never-in mitosis related kinase 10, mitoosiin liittyvä kinaasi, joka ei ole koskaan sisäpuolella 10
NLS	Nuclear localization sequence, tumaan ohjaamissekvenssi
NRIP1	Nuclear receptor-interacting protein 1, tumareseptorin kanssa vuorovaikuttava hormoni 1
OR	Odds ratio, riskisuhde
<i>PALB2</i>	Partner and localizer of <i>BRCA2</i> , <i>BRCA2</i> :n kumppani ja paikallistaja
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen, jakaantuvan solun tuman antigeeni
PCR	Polymerase chain reaction, polymeeraasi ketjureaktio
PgR	Progesteron receptor, progesteronireseptori
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog gene, fosfataasi ja tensiini homologinen geeni
PTHLH	Parathyroid hormone- like hormone, parathyroidi hormonin kaltainen hormoni
pTNM	Pathological tumor-node-metastasis, patologinen kasvain- imusolmuke-etäpesäke määrittely
QPCR	Quantitative polymerase chain reaction, kvantitatiivinen polymeeraasi ketjureaktio
<i>RAD1</i>	Radiation insensitive 1, säteilylle vastuskykyinen 1
<i>RAD9</i>	Radiation insensitive 9, säteilylle vastuskykyinen 9
<i>RAD 51</i>	Radiation insensitive 51, säteilylle vastuskykyinen 51
<i>RAD51B</i>	Radiation sensitive 51B, säteilyherkkä 51B
<i>RAD51C</i>	Radiation sensitive 51C, säteilyherkkä 51C
<i>RAD51D</i>	Radiation sensitive 51D, säteilyherkkä 51D

RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction, reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio
<i>SLC4A7</i>	Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7, liuoksen kantajageeni perhe 4, natriumbikarbonaatin yhteiskuljettaja, jäsen 7
SNP	Single nucleotide polymorphism, yhden nukleotidin polymorfismi
<i>STK11</i>	Serine-threonine protein kinase 11, seriini-treoniini proteiinkinaasi 11
STR	A short tandem repeat, lyhyt toistojakso
<i>STXBP4</i>	Syntaxin binding protein 4, syntaksiiniin sitoutuva proteiini 4
TNP1	Transition protein 1, transitio proteiini 1
<i>TNS1</i>	Tensin 1, tensiini 1
<i>TOM1L1</i>	Target of myb1-like 1, myb1-kaltainen kohde 1
<i>TOX3</i>	TOX high mobility group box family member 3
<i>TP53</i>	Tumor protein 53, kasvainproteiini 53
UV	Ultra violet, ultra violetti
VIC	2'-chloro-7'-phenyl-1, 4-dichloro-6-carboxyfluorescein
XRCC2	X-ray repair cross-complementing protein 2, röntgen korjaus raja täydennys proteiini 2
XRCC3	X-ray repair cross-complementing protein 3, röntgen korjaus raja täydennys proteiini 3

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	8
2. KIRJALLISUUSKATSAUS.....	9
2.1 Rintasyöpä.....	9
2.1.1 Rintasyövän esiintyvyys.....	9
2.1.2 Yleiset riskitekijät.....	11
2.1.3 Rintasyöpäriskiä pienentävät tekijät.....	13
2.1.4 Rintasyöpätyypit.....	14
2.1.5 Rintasyövän luokitus ja erilaistumisaste.....	15
2.1.6 Ennustetekijät.....	17
2.2 Perinnöllinen sairastumisriski.....	19
2.2.1 Korkean ja kohtalaisen riskin geenit.....	19
2.2.2 Lievästi kohonneeseen riskiin liittyvät geenit.....	24
2.3 Uusien rintasyöpägeenien etsiminen.....	27
2.3.1 Kytkeäpätasapaino.....	27
2.3.2 Tapaus-verrokki assosiaatioanalyysi.....	28
2.4 TaqMan-RT-PCR.....	30
2.6 CSE1L/hCAS.....	31
2.6.2 Proteiinin toiminta.....	32
2.6.3 Yhteys syöpään.....	33
2.7 HUS1.....	34
2.7.1 Proteiinin toiminta.....	34
2.7.2 Yhteys syöpään.....	35
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	36
4. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	37
4.1 Aineisto.....	37
4.2 Menetelmät.....	38
4.2.1 Geenien ja polymorfismien valinta.....	38
4.2.2 Genotyypin määrittäminen.....	42
4.2.3 Tilastollinen arviointi.....	43
5. TULOKSET.....	43
5.1 RT-PCR.....	43
5.2 Tilastolliset arvioinnit.....	46
5.2.1 Rintasyöpäriski.....	46
5.2.2 Kliiniset muuttujat.....	48
6. POHDINTA.....	57
LÄHDELUETTELO.....	60

1. JOHDANTO

Rintasyöpä on teollistuneissa maissa naisten yleisin syöpä. Suomessa jopa joka yhdeksäs nainen sairastuu rintasyöpään. (Suomen Syöpärekisteri, 2011).

Rintasyövän kehittymiseen vaikuttavat monet tekijät. Iän myötä rintasyöpäriski kasvaa ja myös pitkä hedelmällinen ikä lisää riskiä sairastua (Trichopoulos ym., 1972, MacMahon ym., 1982, Huovinen & Mustajoki, 2007, Suomen Syöpärekisteri, 2011). Vaihdevuosien jälkeinen merkittävä ylipaino sekä tupakointi ja alkoholin suurkulutus ovat rintasyövän sairastumisriskiä lisääviä tekijöitä. Ionisoiva säteily ja karsinogeenit aiheuttavat perimään mutaatioita ja siten lisäävät syöpäriskiä. (Garfinkel ym., 1988, Howe & McLaughlin 1996, Smith-Warner ym., 1998, Preston ym., 2002, Suzuki ym. 2009).

Yleisten (ympäristön) riskitekijöiden lisäksi rintasyöpään sairastumiseen vaikuttavat perinnölliset tekijät (Claus ym., 1996). On löydetty geenejä, jotka lisäävät rintasyöpään sairastumisriskiä, kuten *BRCA1* ja *BRCA2* (Hall ym., 1990, Miki ym., 1994, Wooster ym., 1994, Wooster ym., 1995). *BRCA1*- ja *BRCA*-geenien mutaatiot selittävät noin 2-3 % kaikista rintasyöpätapauksista (Ford ym., 1995, Newman ym., 1997). Kohtalaisen riskin geenit (*ATM*, *BRIP1*, *PALB2*, *CHEK2*) selittävät yhdessä noin 1 % periytyvistä rintasyöivistä (Pharoah ym., 2008). Lisäksi on matalan riskin geenejä, jotka aiheuttavat yhdessä muiden matalan riskin geenien ja ympäristötekijöiden kanssa rintasyöpää (Lichtenstein ym., 2000, Pharoah ym., 2002). Tällä hetkellä tunnetut geneettiset tekijät, mukaan lukien korkean riskin aiheuttavat geenit, selittävät alle 30 % rintasyövän geneettisestä riskistä (Fletcher & Houlston, 2010, Zhang ym., 2011). Geneettiseen riskiin liittyviä tekijöitä lienee vielä tunnistamatta ja lisätutkimuksia tarvitaan.

Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää liittyvätkö *hCSEIL/CAS*- ja *HUS1*-geenien polymorfismit rintasyöpäriskiin. Polymorfismit (single nucleotide polymorphism, SNP) genotyypattiin RT-PCR TaqMan-menetelmällä ja yhteyttä rintasyöpäriskiin tutkittiin vertailemalla genotyyppifrekvenssejä rintasyöpäpotilaiden ja verrokkihenkilöiden välillä käyttäen tilastollisia menetelmiä. Rintasyöpää sairastavilta tutkittiin myös genotyypin ja kliinispatologisten tekijöiden yhteyttä χ^2 -testillä.

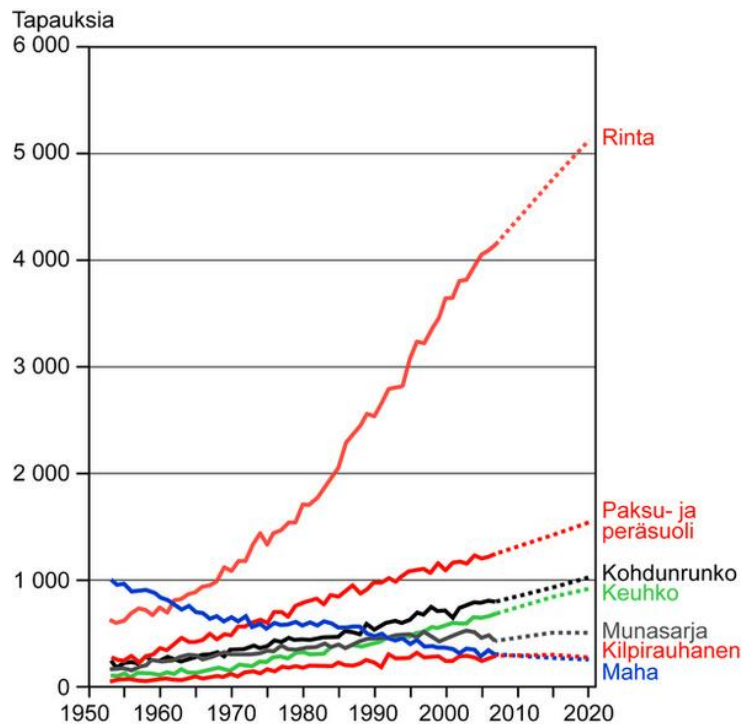
2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Rintasyöpä

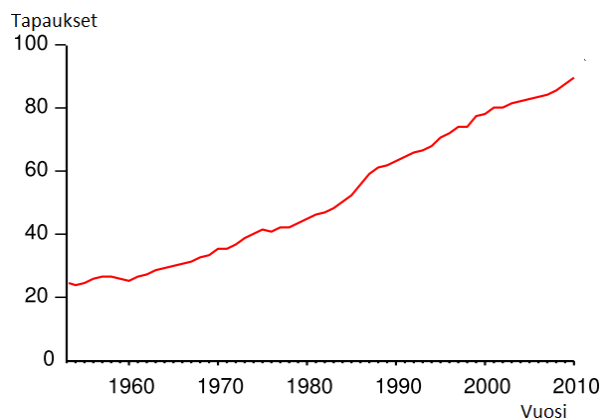
2.1.1 Rintasyövän esiintyvyys

Rintasyöpä on teollistuneissa maissa, kuten myös Suomessa, naisten yleisin syöpä (kuva 1). Suomessa noin joka yhdeksäs nainen sairastuu jossakin elämänsä vaiheessa rintasyöpään. Rintasyöpäkuolleisuus on kuitenkin alentunut 1950-luvulta nykyaikaan asti. Kuolleisuuden vähenemiseen on mahdollisesti syynä varhaisemman vaiheen diagnoosi, mammografiaseulontojen tekeminen yli viidenkymmenen vuoden ikäisille naisille ja parempien hoitomenetelmien kehittyminen. Sitä vastoin uusien rintasyöpätapausten esiintyminen on merkittävästi lisääntynyt. Vuosien 1960–1964 välillä on ollut keskimäärin 779 rintasyöpätapausta vuodessa, kun taas tällä hetkellä vuosittain todetaan jo lähes 4500 uutta tapausta. (Suomen Syöpärekisteri, 2011).

Rintasyöpää esiintyy sekä miehillä että naisilla, mutta miehillä se on erittäin harvinainen (National Cancer Institute, 2011). Rintasyövän esiintyvyys oli Suomessa vuonna 2009 naisilla 4474, joka oli 32,5 % kaikista naisten syöpätapauksista (13781 tapausta) ja miehillä rintasyöpätapauksia oli 26, joka oli 0,18 % kaikista miesten syöpätapauksista (14728 tapausta) (kuva 2). Kuopion Yliopistollisen sairaalan piirissä rintasyövän esiintyvyys oli vuonna 2009 705, joka oli 32,4 % kaikista naisten syöpätapauksista Itä-Suomessa (2174 tapausta). (Suomen Syöpärekisteri, 2011).

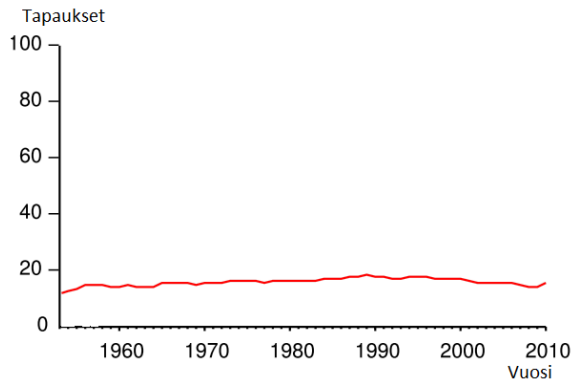


Kuva 1. Naisten yleisimpien uusien syöpätapausten lukumäärät, sekä yleisimpien syöpien mennyt ja ennustettu trendi. (Syöpärekisteri, 2012).



Kuva 2. Rintasyövän esiintyvyys Suomessa ikävakioiduna /100 000. (Syöpäjärjestöt, 2012).

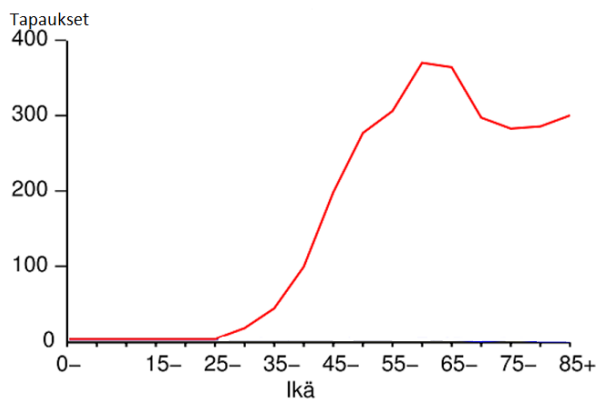
Rintasyöpä on Suomessa naisten yleisin syöpäkuolemien syy. Rintasyöpäkuolleisuus koko Suomessa oli vuonna 2009 naisilla 821, joka oli 15,6 % kaikista naisten syöpäkuolemista (5255 kuolemantapausta) (kuva 3). Rintasyövän eloonjäämisennuste on kuitenkin hyvä; vuosina 2007–2009 mitatut eloonjäämisluvut olivat yhden vuoden jälkeen 97 % ja viiden vuoden jälkeen 89 %. (Suomen Syöpärekisteri, 2011).



Kuva 3. Rintasyöpäkuolleisuus Suomessa ikävakiointuna /100 000. (Syöpäjärjestöt, 2012).

2.1.2 Yleiset riskitekijät

Rintasyövän riski kasvaa 25. ikävuoden jälkeen. Suomessa noin neljäsosa tapauksista on 25–49-vuotiailla, neljäsosa on 50–59-vuotiailla ja noin puolet syöpätapauksista todetaan yli 60-vuotiailla (kuva 4) (Suomen Syöpärekisteri, 2011).



Kuva 4. Rintasyövän ilmaantuvuus eri ikäryhmissä. (Syöpäjärjestöt, 2012).

Hormonaaliset tekijät vaikuttavat rintasyövän syntyyn ja ovat tunnetuimpia riskitekijöitä. Estrogeeneilla on tärkeä rooli rintasyövän synnyssä ja elinikäinen estrogeenialtistus liittyy rintasyöpäriskiin; kuukautisten alkaminen varhaisessa iässä, sekä lapsettomuus tai ensimmäinen synnytys yli 30-vuotiaana, vähäinen imetyksen määrä, myöhäisellä iällä alkavat vaihdevuodet, vaihdevuosi-ikä jälkeinen ylipaino; yli 30 painoindeksi lisää riskiä noin 30 %, ehkäisytablettien pitkäaikainen käyttö sekä yli 5 vuotta kestävä hormonikorvaushoito vaihdevuosi-ikä jälkeen lisäävät riskiä sairastua rintasyöpään, koska ne lisäävät kehon altistusta estrogeeneille (Trichopoulos ym., 1972, MacMahon ym., 1982, Layde ym., 1989, Ewertz ym. 1990, Folsom ym., 1990, Hunter & Willet, 1993, Kelsey ym., 1993, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast

Cancer, 1996, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997, Huovinen & Mustajoki, 2007). Aiemmin sairastettu rintasyöpä tai hyvänlaatuinen (benigni) rintasairaus lisää riskiä sairastua rintasyöpään (Dupont & Page 1985, Carter ym., 1988, Wang ym., 2004). Lobulaarisen karsinoma in situ (LCIS) on todettu lisäävän rintasyöpäriskiä; rintasyöpä kehittyy 8-11 kertaa useammin naisille, joilla on LCIS kuin naisille, joilla muutosta ei ole (Page ym., 1991, Syöpäjärjestöt, 2011).

Vähemmän tutkittu riskitekijä on mm. altistuminen ionisoivalle säteilylle, joka aiheuttaa soluissa vaurioita. Solujen vaurioista voi kehittyä vuosia myöhemmin rintasyöpä, joka on todettu mm. säteilyonnettomuuksien yhteydessä (Garfinkel ym., 1988, Howe & McLaughlin 1996, Smith-Warner ym., 1998, Preston ym., 2002). Lapsena tai nuorena saatu sädehoito, joka on kohdistunut myös rintarauhas kudokseen, lisää rintasyöpäriskiä (Syöpäjärjestöt, 2011). Myös ympäristön estrogeenien (xenoestrogeenit) kertyminen elimistöön on yhdistetty rintasyöpäriskiin (Davis ym., 1993). Riskiä lisäävät myös vähäinen liikunta, ravitsemukselliset tekijät, kuten liiallinen energian- tai rasvansaanti sekä punaisen lihan liikakäyttö, lisäksi myös runsas alkoholin käyttö ja tupakointi on yhdistetty lisääntyneeseen rintasyöpäriskiin (Garfinkel ym., 1988, Bernstein ym., 1994, Smith-Warner ym., 1998, Zheng ym., 1998, Bartch ym., 1999, Nair ym., 1999, Gram ym., 2005, Johnson 2005). Myös rodulla, kansallisella alkuperällä sekä maantieteellisellä sijainnilla on huomattu olevan yhteys rintasyöpäriskiin (Ziegler ym., 1993).

Merkittävin yksittäinen rintasyövän sairastumisvaaraa lisäävä tekijä on positiivinen sukuhistoria. Noin 5-10 % rintasyöivistä on arveltu olevan perheittäin esiintyviä (perinnöllisiä) (Claus ym., 1996). Kaksostutkimusten mukaan kuitenkin jopa neljäsosassa rintasyöivistä on perinnöllisiä tekijöitä mukana (Lichtenstein ym., 2000). Riski sairastua rintasyöpään on noin kaksikertaa suurempi naisilla, joiden lähisukulaisella on ollut rintasyöpä, verrattuna naisiin, joiden lähisukulaisilla ei ole rintasyöpää. Rintasyöpäriski kasvaa sitä mukaa kun sairastuneiden lähisukulaisten määrä lisääntyy. (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

2.1.3 Rintasyöpäriskiä pienentävät tekijät

Varhaiset ja useat raskaudet suojaavat vaihdevuosien jälkeiseltä rintasyövältä istukkagonadotropiinin vaikutuksesta (Janerich & Hoff, 1982, Russo & Russo, 2000), mutta raskaushormonit, kuten estrogeeni, voivat kuitenkin aiheuttaa piilevän rintasyövän aktivoitumisen ja varhaisen ilmaantumisen (Lambe ym., 1994). Raskaudet eivät suojaa nuorta naista geneettistä alkuperää olevalta rintasyövältä (Jernström ym., 1999). Rintojen poisto ennaltaehkäisevästi vähentää rintasyövän ilmaantuvuutta noin 90 % naisilla, joilla esiintyy rintasyöpää suvussa (Eeles ym., 1996, Klijn ym., 1997, Hartmann ym., 1999). Myös hormonituotannon lopettaminen munasarjoissa ennen vaihdevuosia munasarjojen poistoleikkauksella tai LHRH-analogihoidolla (Luteinisoivaa hormonia vapauttava hormoni, Luteinising Hormone Releasing Hormone) vähentää riskiä sairastua rintasyöpään (Bundred, 2001).

Säännöllinen liikunta ehkäisee rintasyöpää. Tutkimuksessa, jossa selvitettiin 74171 50–79 -vuotiaan naisen liikuntatottumuksia 18, 35 ja 50 vuoden iässä, saatiin viitteitä että, suositusmäärä liikuntaa on noin 30 minuuttia päivässä (McTiernan ym., 2003). Samassa tutkimuksessa huomattiin että, naisilla jotka olivat harrastaneet kohtuukuormitteista liikuntaa, kuten reipasta kävelyä, ainakin kolme kertaa viikossa 35 vuoden ikäisinä, oli 14 % pienempi rintasyövän riski kuin vähemmän liikkuvilla. 50-vuotiaana kohtuukuormitteista liikuntaa harrastavilla naisilla oli pienentynyt rintasyöpäriski. Liikunta auttaa myös painonhallinnassa, jolloin ylipainon aikaansaama riski sairastua pienenee. (McTiernan ym., 2003).

Myös ravintoaineet voivat suojata rintasyövältä. Erään tutkimuksen mukaan D-vitamiinin runsaan saannin on huomattu suojaavan rintasyövältä (Chen ym., 2010), mutta muissa tutkimuksissa ei ole saatu luotettavia tuloksia D-vitamiinin vaikutuksesta rintasyövän ehkäisemiseen (Gissel ym., 2008). Omega-3 rasvahapot näyttäisivät suojaavan rintasyövältä, mutta omega-6 rasvahappojen merkityksestä on saatu ristiriitaisia tuloksia (Simonsen ym., 1998, Thiébaud ym., 2009). Joidenkin tutkimusten mukaan omega-6 rasvahappojen saanti pähkinöistä lisäisi rintasyöpäriskiä, mutta saanti kasviöljyistä vähentäisi rintasyöpäriskiä. (Simonsen ym., 1998, Thiébaud ym., 2009). Välimeren ruokavalio ja erityisesti oliiviöljy on yhdistetty rintasyövältä suojaaviksi tekijöiksi eräissä tutkimuksissa (Menendez ym., 2008, Murtaugh ym., 2008, Trichopoulou ym., 2010). Vihreä tee näyttäisi suojaavan rintasyövältä, jos sitä juodaan

yli viisi kupillista päivässä, ja soija näyttäisi suojaavan rintasyövältä vain aasialaisia naisia (Seely ym., 2005, Nagata, 2010). Myös runsaan kalsiumin saannin on todettu vähentävän rintasyöpäriskiä 19 % (Chen ym., 2010).

2.1.4 Rintasyöpätyypit

Rintasyöpä jaetaan kahteen tyyppiin syöpäsolujen alkuperän perusteella. Rintatiehyistä alkanut syöpä nimetään tiehytperäiseksi (duktaalinen) rintasyöväksi. Rinnan rauhasrakenteesta alkanut syöpä on rauhasperäinen (lobulaarinen) rintasyöpä. (World Health Organization, 1981).

Noin 75–80 % rintasyöivistä on tiehytperäisiä (World Health Organization, 1981). Tiehytperäisessä rintasyövässä rintatiehyeen solu menettää kontrollin ja alkaa jakaantua muodostaen kasvaimen. Tiehytperäinen kasvain tunkeutuu rintatiehyen sisältä ympäröivään kudokseen, jolloin kyseessä on rintasyöpä. Rintasyövän esiasteeksi luokiteltava duktaalinen karsinooma *in situ* (DCIS) on kasvain, joka ei ole vielä levinnyt rintatiehyiden ulkopuolelle. (van Diest, 1999, Reis-Filho & Lakhani, 2003).

Rauhasperäinen rintasyöpä on toiseksi yleisin rintasyöpätyyppi (5-15 % rintasyöivistä) (Fortunato ym., 2011, Kim ym., 2011). Rauhasperäisellä kasvaimella on suurempi taipumus esiintyä molemmissa rinnoissa kuin tiehytperäisellä kasvaimella ja rauhasperäinen kasvain muodostaa useammin etäpesäkkeitä (Syöpäjärjestöt, 2011).

Rintasyövän muita, harvinaisempia tyyppejä ovat tubulaarinen, kribriforminen, musinoosi, medullaarinen ja papillaarinen. Nämä tyypit uusivat harvemmin kuin tiehytperäinen ja rauhasperäinen. Poikkeuksena kuitenkin on medullaarinen, jonka ennuste on samanlainen kuin yleisten muotojen ennuste. Pagetin tauti on harvinainen DCIS:n erikoistyyppi. Pagetin taudin kliinisenä löydöksenä on vetistävä ihottuma nännissä, jolloin maitorauhastiehyistä löytyy syöpäsoluja (*in situ* -muutos). Tämä tyyppi ei yleensä tunkeudu syvemmälle rauhaskudokseen. (Syöpäjärjestöt, 2011).

Tulehduksellinen (inflammatorinen) rintasyöpä on myös yksi harvinaisista rintasyöpätyypeistä. Tulehduksellisessa rintasyövässä rintarauhasessa esiintyy tulehdusoireiston kaltainen tila, jolloin rinta on punainen, kuumottava ja turvonnut.

Tulehduksellinen rintasyöpäkasvain voi olla tyypiltään joko tiehyt- tai rauhasperäinen. (Syöpäjärjestöt, 2011).

2.1.5 Rintasyövän luokitus ja erilaistumisaste

Rintasyövän levinneisyys luokitellaan joko levinneisyysaste-luokituksen avulla (Singletary ym., 2002) (taulukko 1) tai pTNM-luokituksen avulla (International Union Against Cancer, 1950, The American Joint Committee for Cancer, 1997) (taulukko 2).

Taulukko 1. Rintasyövän luokitus levinneisyyden mukaan. p= patologisanatomisesti varmistettu, T= primaarikasvain, N= alueelliset imusolmukkeet ja M=etäpesäke. (Singletary ym., 2002, Käypä hoito, 2007).

Levinneisyysaste	Primaarikasvain	Alueelliset	
		imusolmukkeet	Etäpesäkkeet
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIa	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIb	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIa	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIb	T4	Mikä tahansa N	M0
	Mikä tahansa T	N3	M0
IV	Mikä tahansa T	Mikä tahansa N	M1

Taulukko 2. Rintasyövän pTNM-luokitus. Taulukossa p= patologisanatomisesti varmistettu, T= primaarikasvain ja N= alueelliset imusolmukkeet; mikäli luokitus perustuu vain vartijaimusolmukkeiden tutkimukseen, käytetään lisämäärettä sn (sentinel node) esim. pN0 (sn), M=etäpesäke. (International Union Against Cancer, 1950, American Joint Committee for Cancer, 1997, Käypä hoito, 2007).

Lyhenne	Selitys
pTis	Preinvasiivinen karsinooma, carcinoma in situ, duktaalinen carcinoma in situ (DCIS), lobulaarinen carcinoma in situ (LCIS) tai Pagetin tauti, jonka yhteydessä ei ole osoitettavissa kasvainta.
pT0	Ei viitteitä primaarikasvaimesta
pT1	Kasvaimen suurin läpimitta < 2 cm
pT1mic	Mikroinvaasio < 1 mm
pT1a	Kasvaimen suurin läpimitta > 1 mm, <= 5 mm
pT1b	Kasvaimen suurin läpimitta > 5 mm, <= 10 mm
pT1c	Kasvaimen suurin läpimitta > 10 mm, <= 20 mm
pT2	Kasvaimen suurin läpimitta 20–50 mm
pT3	Kasvaimen suurin läpimitta > 50 mm
pT4	Minkä tahansa kokoinen kasvain, joka kasvaa suoraan ihoon tai rintakehän seinämään
pT4a	Kasvain on kiinnittynyt rintakehän seinämään
pT4b	Appelsiini-iho (peau d'orange) tai saman rinnan alueella olevia satelliittipesäkkeitä tai haavauma
pT4c	pT4a ja pT4b
pT4d	Inflammatorinen (tulehduksellinen) karsinooma
pTx	Primaarikasvaimen kokoa ei ole voitu määrittää
pN0	Ei metastasointia paikallisiin kainaloimusolmukkeisiin. ITC (isolated tumor cells, yksittäiset kasvainsolut imusolmukkeessa) luokitellaan pN0. Tällöin kasvainsolut ovat yksittäin tai muutaman solun rykelmässä kooltaan <0.2 mm.
pNo(i-)	Morfologisessa tutkimuksessa ei todeta yksittäisiä kasvainsoluja (ITC)
pN0(i+)	Morfologisessa tutkimuksessa löydetään yksittäisiä kasvainsoluja (ITC)
pN0(mol-)	Histologisessa tutkimuksessa ei todeta etäpesäkkeitä, ei-morfologisissa tutkimuksissa ei ITC löydy.
pN0(mol+)	Histologisessa tutkimuksessa ei todeta etäpesäkkeitä, ei-morfologisissa tutkimuksissa ITC löydy
pN1mi	Mikrometastaasi > 0.2 mm, (0.2 mm > 2 mm)
pN1	Etäpesäke 1–3 kainaloimusolmukkeessa tai mikroskopiassa todettu etäpesäke kliinisesti negatiivisessa rintalastan vereisessä vartijaimusolmukkeessa.
pN1a	Metastaasi 1–3 kainaloimusolmukkeessa (näistä ainakin yksi > 2 mm)
pN1b	Rintalastan vereisessä vartijaimusolmukkeessa mikroskopiassa todettu etäpesäke
pN1c	pN1a ja pN1b
pN2	Etäpesäkkeitä 4–9 kainaloimusolmukkeessa tai kliinisesti todettu etäpesäke rintalastan vereisessä imusolmukkeessa, kun kainaloimusolmukkeessa ei ole kasvainta.
pN2a	Etäpesäkkeitä 4–9 kainaloimusolmukkeessa (ainakin yksi > 2 mm)
pN2b	Kliinisesti todettu etäpesäke rintalastan vereisessä imusolmukkeessa, kun kainaloimusolmukkeessa ei ole kasvainta.
pN3	Etäpesäkkeitä yli kymmenessä kainaloimusolmukkeessa tai solisluun alapuolisissa imusolmukkeissa tai kliinisesti todettuina rintalastan vereisissä imusolmukkeissa, kun myös kainaloimusolmukkeissa on metastasointia, tai etäpesäkkeitä yli kolmessa kainaloimusolmukkeessa ja mikroskopiassa todettu etäpesäke kliinisesti negatiivisissa rintalastan vereisissä imusolmukkeissa tai solisluun yläpuolisissa imusolmukkeissa.
pN3a	Etäpesäkkeitä yli kymmenessä kainaloimusolmukkeessa (ainakin yksi > 2 mm) tai etäpesäke solisluun alapuolisissa imusolmukkeissa.
pN3b	Kliinisesti todettu etäpesäke rintalastan vereisissä imusolmukkeissa kainalon imusolmukemetastasoinnin yhteydessä tai etäpesäkkeitä yli kolmessa kainaloimusolmukkeessa, kun kliinisesti negatiivisesta rintalastan vereisestä vartijaimusolmukkeesta löytyy mikroskopiassa etäpesäke.
pN3c	Etäpesäke solisluun yläpuolisissa imusolmukkeissa
pM0	Ei etäpesäkkeitä
pM1	Etäpesäkkeitä

M-luokan eli etäpesäkkeet ilmoittavan –luokan määrittäminen kertoo kasvaimen leviämisestä muihin elimiin. M0 tarkoittaa, että kasvain ei ole levinnyt ja M1 tarkoittaa, että kasvain on levinnyt muualle elimistöön tai että alkuperäistä kasvainta ei voi poistaa (American Joint Committee for Cancer, 1997). Noin 70 %:lla uusiutuvista rintasyöpätapauksista rintasyöpä leviää luustoon (Coleman, 1997). Muita Rintasyövälle

tyypillisiä etäpesäkekohteita ovat keuhkot, maksa, ylävartalon iho ja imusolmukkeet, vatsaontelon kalvopinnat ja imusolmukkeet sekä aivot (Coleman, 1997).

Mikroskooppitutkimuksessa määritetään leikkauksessa poistetusta syöpäkasvaimesta rintasyövän histologisen tyypin lisäksi sen erilaistumisaste (gradus). Erilaistumisasteeseen vaikuttavat muun muassa syöpäsolujen ulkomuoto ja solujen jakautuminen. Hyvin erilaistunut gradus I -kasvain muistuttaa eniten normaalia rintakudosta ja on yleensä hyväennusteisin. Gradus II -kasvaimet ovat hyväennusteisen ja huonoennusteisen kasvaimen välimuotoja. Gradus III -kasvaimet ovat huonosti erilaistuneita ja niissä todetaan syövän ärhäkkään kasvutapaan liittyviä piirteitä. (World Health Organization, 1981).

2.1.6 Ennustetekijät

Rintasyövän ennustetekijät ovat syöpään liittyviä tekijöitä, joiden esiintymisellä on huomattu olevan yhteys syövän poikkeavan uusiutumisen todennäköisyyteen sekä rintasyöpäkuoleman vaaraan. Ennustetekijät voidaan jakaa kahteen osaan; prognostiset tekijät ja prediktiiviset tekijät. Prognostiset tekijät ovat syövän uusiutumista ennustavia tekijöitä kun taas prediktiiviset tekijät ennustavat hoitovastetta. (Toikkanen ym., 1990, Gasparini ym., 1993, Rosen ym., 1995, Scholl ym., 1996, Donegan, 1997, Fresno ym., 1997).

Prognostisia ennustetekijöitä arvioitaessa määritetään yleensä kasvaimen koko (läpimitta), joka mitataan poistetusta kasvaimesta ja ilmoitetaan kolmiulotteisesti. Leviäminen kainaloimusolmukkeisiin määritetään, sillä kainalon imusolmukemetastaasien ilmaantumisesta pidetään tärkeimpänä syövän uusiutumista ennustavana tekijänä. (Carter ym., 1989, Rose ym., 1989, Ries ym., 1994). Kasvaimesta tutkitaan myös histologinen erilaistumisaste (invasiiviset karsinoomat) tai tumagradus, asteikolla I-III, jossa hyvä erilaistumisaste (gradus I) viittaa hyvään ennusteeseen ja huono erilaistumisaste (gradus III) huonoon ennusteeseen (Toikkanen ym., 1990). Muita histologisia piirteitä ovat syöpäsolukon tunkeutuminen imu- tai verisuoniin, joka liittyy huonoon eloonjäämisennusteeseen, sekä kasvainsolukon tunkeutuminen ihoon. (Blanco, 2001).

Syöpäsolujen jakaantumisenopeus (proliferaatioaste) on tutkimusten mukaan vahva ja itsenäinen prognostinen ennustetekijä rintasyövässä. Syöpäsolujen jakaantumisenopeus voidaan määrittää useilla eri menetelmillä. Nämä menetelmät perustuvat mm. mittoosien laskemiseen histologisesta näytteestä, immunohistokemiallisiin tekniikoihin (kuten Ki-67, PCNA) sekä solunjakautumisen S-vaiheessa olevien solujen määrittämiseen staattisella sytometrialla tai virtaussytometrialla. Eri syöpäsolujen jakaantumisenopeuden määrittämenetelmien paremmuus on epäselvä. (Hedley ym., 1993, Witzig ym., 1993, Remvikos ym., 1997).

Lisäksi on vartijaimusolmukebiopsia, jonka avulla voidaan ennustaa rintasyöpäpotilaan selviytymistä. Sitä voidaan käyttää myös rintasyöpäleikkauksen suunnitteleamiseen. Vartijaimusolmukebiopsiassa rintaan ruiskutetaan ennen leikkausta radioaktiivista ainetta tai siniväriä. Radioaktiivisen aineen tai sininvärin kulkeutumisen avulla voidaan löytää leikkauksen yhteydessä ne imusolmukkeet, joista mahdolliset etäpesäkkeet löytyvät ensimmäisenä, jos syöpä on levinnyt. Tutkimusten mukaan vartijaimusolmukebiopsia kertoo kainalometaasien esiintyvyydestä 97 %:ssa rintasyöpätapauksista (Lieberman ym., 2001). On tutkittu että kainalon syöpä ei ole uusiutunut potilailla, joilta on poistettu terve vartijaimusolmuke kainalosta (Schrenk ym., 2001).

Prediktiivisiä ennustetekijöiden määrityksiä ovat estrogeeni- ja progesteronireseptorimääritykset, joita käytetään apuna rintasyövän lääkehoitoja valittaessa ja potilaan selviytymisen arvioinnissa. Tutkimusten mukaan hormonireseptoriposiitiiviset kasvaimet reagoivat suotuisasti hormonaaliselle hoidolle (Hähnel ym., 1985, Isaacs ym., 2001). Estrogeenireseptorin (ER) ja progesteronireseptorin (PgR) esiintyminen kasvaimessa liittyy parempaan eloonjäämisennusteeseen (Elston ym., 1991).

HER-2-onkokeenin (Human Epidermal growth factor Receptor 2, ihmisen epidermaalinen kasvutekijä reseptori 2) määrittäminen on tärkeää, koska *HER-2*-geeniä tuotetaan liikaa 25–30 %:ssa rintasyöpätapauksista. *HER-2*-geenin monistuminen viittaa keskimääräistä huonompaan ennusteeseen. *HER-2*-onkokeeni tuottaa solukalvon läpäisevää (transmembraani) tyrosiinikinaasireseptoria, joka on lähes samanrakenteinen epidermaalisen kasvutekijäreseptorin kanssa. (Huovinen ym., 2007, Joensuu ym., 2007).

HER-2-onkogeenin kliininen merkitys liittyy rintasyöpälääkkeeseen. Lääkkeen vastaaine hillitsee *HER-2*-reseptoriproteiinin ylituotannon aktivoimaa syöpäsolujen kasvua liittymällä proteiiniin ja estäen sen toimintaa. (Bono & Joensuu, 2010).

2.2 Perinnöllinen sairastumisriski

Rintasyövistä noin 5-10 % on arveltu olevan perheittäin esiintyviä (Claus ym., 1996). Perheittäin esiintyvään korkean riskin rintasyöpään liittyvien geenien sairastumista aiheuttavat alleelit ovat erittäin harvinaisia (Lichtenstein ym., 2000). Nykyisin tunnetut korkean riskin geenit selittävät vain noin 20 % perheittäin esiintyvistä rintasyövistä (Thompson & Easton, 2004, Varghese & Easton, 2010) ja korkean riskin geenivirhe löytyy todennäköisemmin alle 35-vuotiailta rintasyöpäpotilailta (Eerola ym., 2002). Matalan riskin geenit ovat suhteellisen yleisiä väestössä ja on arvioitu, että ne aiheuttavat lisääntyneen rintasyöpäriskin myös perheittäin esiintyvissä rintasyövässä (Pharoah ym., 1997, Antoniou ym., 2002).

2.2.1 Korkean ja kohtalaisen riskin geenit

Korkean riskin geenit altistavat syöväälle ja alttius periytyy jälkeläisille mendelistisesti. Tällä hetkellä tunnetut korkean riskin geenit selittävät vain noin 15–20 % kaikista periytyvistä rintasyöpätapauksista (Claus ym., 1996, Szabo ym., 1997, Easton 1999, Peto ym., 1999, Anglian Breast Cancer Study Group, 2000, Thompson & Easton 2004, Varghese & Easton, 2010). Tärkeimmät näistä geneeistä ovat *BRCA1* ja *BRCA2* (breast cancer 1 ja 2) (Hall ym., 1990, Miki ym., 1994, Wooster ym., 1994, Wooster ym., 1995). Mutaatiot *BRCA1*- ja *BRCA2*-geneeissä selittävät mahdollisesti vain noin 2-3 % kaikista rintasyöpätapauksista (Ford ym., 1995, Newman ym., 1997). Kohtalaisen riskin geenit (*ATM*, *BRIP1*, *PALB2*, *CHEK2*) selittävät yhdessä noin 1 % periytyvistä rintasyövistä (Pharoah ym., 2008). Tällä hetkellä tunnetut korkean ja kohtalaisen riskin rintasyöpägeenit, niihin liittyvä rintasyöpäriski sekä geenin/proteiinin toiminta on esitelty taulukossa 3.

Taulukko 3. Korkean ja kohtalaisen riskin geenit, niiden toiminta solussa sekä geeneihin liittyvä rintasyöpäriski.

Geeni	Toiminta	Rintasyöpäriski
<i>BRCA1 (breast cancer 1, rintasyöpä 1)</i>	<i>BRCA1</i> on kasvunrajoitegeeni, joka toimii portinvartijana rajoittamalla kasvaimen kehittymistä tai aiheuttamalla solukuoleman (Schutte ym., 1995, Thompson ym., 1995, Holt ym., 1996, Kinzler & Vogelstein 1997, Wang ym. 2002). <i>BRCA1</i> -proteiini toimii genomisen tasapainon sekä kromosomien stabiliteetin säilyttämisessä, kuten DNA:n korjauksessa esim. replikaation tai transkription jälkeisten virheiden korjaamisessa sekä vuorovaikuttaa monien molekyylien, kuten DNA:n korjaukseen osallistuvien proteiinien, muiden kasvunrajoitegeenien, onkogeenien sekä solusyklin säätelijöitten kanssa (Chapman ym., 1996, Scully ym., 1997, Tirkkonen ym., 1997, Yarden & Brody 1999, Xu ym., 1999, Bochar ym., 2000, Scully & Livingston 2000, Wang ym., 2000, Welsch ym., 2000, Borg ym., 2001, Welsch & King 2001, Venkitaraman ym., 2002).	Keskimääräinen kumulatiivinen riski <i>BRCA1</i> -geenimutaation kantajilla on 70 ikävuoteen mennessä 65 % (Antoniou ym., 2003) ja korkean riskin suvuissa vastaava riski on 70 % (Easton ym., 1995, Ford ym., 1998). Yleinen suhteellinen rintasyöpäriski on 30-39-vuotiailla 33, 40-49-vuotiailla 32, 50-59-vuotiailla 18 ja 60-69-vuotiailla 14 (Antoniou ym., 2003).
<i>BRCA2 (breast cancer 2, rintasyöpä 2)</i>	<i>BRCA2</i> on kasvunrajoitegeeni, joka toimii portinvartijana rajoittamalla kasvaimen kehittymistä tai aiheuttamalla solukuoleman (Schutte ym., 1995, Thompson ym., 1995, Holt ym., 1996, Kinzler & Vogelstein 1997, Wang ym., 2002). <i>BRCA2</i> -proteiini toimii genomisen stabiilisuuden ylläpitämisessä, kuten DNA:n korjauksessa esim. replikaation tai transkription jälkeisten virheiden korjaamisessa sekä vuorovaikuttaa monien säätelyproteiinien, kuten RAD51, <i>BRCA1</i> sekä DSS1 kanssa (Milner ym., 1997, Tirkkonen ym., 1997, Fuks ym., 1998, Xu ym., 1999, Scully & Livingston 2000, Welsch ym., 2000, Venkitaraman ym., 2002, Xia ym., 2006).	<i>BRCA2</i> -geenin mutaation kantajilla keskimääräinen kumulatiivinen riski sairastua rintasyöpään on 70 ikävuoteen mennessä 45 % (Antoniou ym., 2003), mutta korkean riskin suvuissa vastaava riski on noin 85 % (Easton ym., 1995, Ford ym., 1998). Yleinen suhteellinen rintasyöpäriski on 30-39-vuotiailla 16, 40-49-vuotiailla 9,9, 50-59-vuotiailla 12 ja 60-69-vuotiailla 11 (Antoniou ym., 2003).

Taulukko 3 jatkuu.

<i>TP53 (tumor protein 53, kasvainproteiini 53)</i>	<p>TP53-proteiini toimii transkriptiotekijänä ja se aktivoidaan vasteena monille solun stressitiloille, kuten ionisoivalle säteilylle ja UV-valolle (Vogelstein ym., 2000). <i>TP53</i> kasvunrajoitegeeni osallistuu keskeisiin transkription säätelytapahtumiin solun kasvussa sekä kuolemassa. Syöväälle altistavat mutaatiot <i>TP53</i>-geenissä vaikuttavat keskeisiin solun kasvuun sekä kuolemiseen liittyviin aineenvaihdunnallisiin tapahtumiin. <i>TP53</i>-geeniä kutsutaan genomien vartijaksi. (Vogelstein, 1990). Eräät mutaatiot <i>TP53</i>-geenissä aiheuttavat Li-Fraumeni-syndrooman (LFS) (Malkin ym., 1990). LFS on harvinainen autosomaalinen sairaus, jossa on suurentunut riski sairastua erilaisiin syöpiin, kuten rintasyöpään (Li & Fraumeni 1969, Li ym., 1988).</p>	<p>LFS:ää sairastavilla naisilla on 18-kertainen riski sairastua rintasyöpään ennen 45-vuoden ikää verrattuna muuhun väestöön (Garber ym., 1991).</p>
<i>ATM (ataxia-telangiectasia mutated, ataxia-telangiectasia mutatoitunut)</i>	<p>ATM on seriini-treoniinikinaasi, joka aktivoituu vasteena ionisoivasta säteilystä aiheutuvalle DNA-vauriolle. ATM vähentää DNA-synteesiä vaurion jälkeen estämällä solusyklin etenemisen G1-vaiheesta S-vaiheeseen. (Canman ym., 1998). Se säätelee myös monien kasvunrajoitegeenien toimintaa (Banin ym., 1998, Canman ym., 1998, Matsuoka ym., 1998, Cortez ym., 1999). Bialleelinen mutaatio <i>ATM</i>-geenissä aiheuttaa harvinaisen autosomaalisen resessiivisen sairauden Ataxia-telangiectasia (A-T), jossa on oireina mm. herkkyys ionisoivalle säteilylle, heikentynyt immuunipuolustus sekä suurempi riski saada pahanlaatuisia kasvaimia (Canman ym., 1998, Kastan & Lim 2000).</p>	<p>Heterotsygoottista <i>ATM</i>-mutaatiota kantavilla A-T potilaiden sukulaisnaisilla on 2-7-kertainen rintasyöpäriski (Swift ym., 1987, Pippard ym., 1988, Borresen ym., 1990, Swift ym., 1991, Easton ym., 1994, Athma ym., 1996, Olsen ym., 2001, Thompson ym., 2005) On myös osoitettu että A-T-perheiden ulkopuolella yleinen suhteellinen rintasyöpäriski on 2,37 (Renwick ym., 2006).</p>

Taulukko 3 jatkuu.

<p><i>PTEN (phosphatase and tensin homolog gene, fosfataasi ja tensiini homologinen geeni)</i></p>	<p><i>PTEN</i>-geeni toimii kasvunrajoitegeeninä sekä säätelee p53 stabilisuutta, ja ylläpitää myös genomista stabiilisuutta tumassa (Liaw ym., 1997, Stambolic 2001, Mayo & Donner 2002, Freeman ym., 2003, Lian & Cristofano 2005, Déléris ym., 2006, Li ym., 2006). Mutaatiot <i>PTEN</i>-kasvunrajoitegeenissä Cowdenin syndrooma -perheissä on yhdistetty syöpään (Starink ym., 1986, Longy & Lacombe 1996). Cowdenin Syndrooma (CS) on autosomaalinen dominantti sairaus, johon liittyy eri elinten (erityisesti ihon, suun ja nenän limakalvojen, suoliston, kilpirauhasen sekä rintarauhasen) hyvänlaatuisten kasvainten muodostuminen (Nelen ym., 1996, Liaw ym., 1997, Eng 2003). CS:aan liittyy myös kohonnut riski kilpirauhassyöpään, rintasyöpään ja kohdun limakalvon syöpään (Longy & Lacombe 1996, Botma ym., 2002).</p>	<p>CS-perheissä <i>PTEN</i>-geenin mutaatiot aiheuttavat 25-50 % elinikäisen riskin sairastua rintasyöpään. CS ja <i>PTEN</i>-mutaatio aikaistavat rintasyöpään sairastumista noin 10 vuodella verrattuna sporadisiin tapauksiin (Starink ym., 1986, Longy & Lacombe 1996).</p>
<p><i>CHEK2 (checkpoint kinase 2, tarkastuspiste kinaasi 2)</i></p>	<p><i>CHEK2</i> on G2 tarkastuspistekinaasi, joka toimii genomisen tasapainon ylläpidossa ja valvoo solusyklin vasteita (Matsuoka ym., 1998). Se säätelee myös apoptoosia (Yang ym., 2002). ATM aktivoi <i>CHEK2</i>-geenin vasteena DNA:n kaksoisjuosteen vauriolle sekä replikaatiosilmukan ongelmille. Lisäksi <i>CHEK2</i> stabilisoi p53:n ja fosforyloi BRCA1:n DNA-vaurion jälkeen. (Matsuoka ym., 1998). On havaittu, että <i>CHEK2</i> on mutatoitunut joissakin periytyvissä rintasyövissä. (<i>CHEK2</i>-Breast Cancer Concoortium 2002, Vahteristo ym., 2002, Meijers-Heijboer ym., 2003, Oldenburg ym., 2003).</p>	<p><i>CHEK2</i>-geenin1100delC variantti aiheuttaa naisille noin 2,7-kertaisen rintasyöpäriskin ja naisille, joilla on perheessä rintasyöpää 4,7 kertaisen riskin (Weischer ym., 2008).</p>
<p><i>LKB1= STK11 (serine-threonine protein kinase 11, seriini-treoniini proteiinkinaasi 11)</i></p>	<p>Sukusolulinjan mutaatiot <i>LKB1</i>-geenissä aiheuttavat Peutz-Jeghers syndrooman, joka on harvinainen autosomaalinen dominantti sairaus. Sairaus lisää mm. ruuansulatuskanavan syöpien ja rintasyövän riskiä. (Giardiello ym., 1987, Tomlinson & Houlston 1997, Hemminki ym., 1998, Jenne ym., 1998, Giardiello ym., 2000).</p>	<p><i>LKB1</i>-geenin mutaatio näyttäisi lisäävän rintasyöpäriskiä vain niillä, joilla on Peutz-Jeghers syndrooma (Chen & Lindblom 2000, de Jong ym., 2002). Kumulatiivinen riski sairastua on jopa 45 % 70-ikävuoteen mennessä (Hearle ym., 2006).</p>

Taulukko 3 jatkuu.

<i>PALB2 (partner and localizer of BRCA2, BRCA2:n kumppani ja paikallistaja)</i>	<i>PALB2</i> on geeni, joka koodaa BRCA2:n kanssa vuorovaikuttavaa proteiinia. <i>PALB2</i> -BRCA2 vuorovaikutus on tärkeä BRCA2:n DNA-kaksoisjuosteen korjausmekanismeissa (Xia ym., 2006). Bialleelinen <i>PALB2</i> -geenin mutaatio aiheuttaa Fanconi anemian N-alatyyppin (FA-N). FA on harvinainen autosomaalinen resessiivinen oireyhtymä, jolle on tyypillistä synnynnäiset epämuodostumat, etenevä luuytimen toiminnan heikkeneminen sekä kohonnut syöpäalttius (D'Andrea & Grompe 2003, Reid ym., 2007). <i>PALB2</i> monoalleelinen mutaatio liittyy kohonneeseen rintasyöpä riskiin (Xia ym., 2006, Rahman ym., 2007).	Rintasyöpäriski on 2,3-kertaa suurempi monoalleelisen mutaation kantajilla verrattuna yleiseen väestöön (Rahman ym., 2007).
<i>BRIP1 (BRCA1-interacting protein 1 gene, BRCA1:n kanssa vuorovaikuttava geeni 1)</i>	<i>BRIP1</i> :n koodaama proteiini toimii DNA:n korjauksessa homologisessa rekombinaatiossa (Liang ym., 1998, Moynahan ym., 1999, Moynahan ym., 2001, Wang ym., 2004). <i>BRIP1</i> -proteiini vuorovaikuttaa myös BRCA1-proteiinin kanssa (Jacquemont ym., 2007, Garcia ym., 2008). Bialleelinen mutaatio <i>BRIP1</i> :ssä aiheuttaa yhden Fanconi anemian alatyyppin J (FANCI) ja monoalleelinen mutaatio on liitetty kohonneeseen rintasyöpäriskiin (Levrin ym., 2005, Seal ym., 2006).	Mutaatio <i>BRIP1</i> - geenissä aiheuttaa noin kaksinkertaisen rintasyöpäriskin kantajalleen (Levrin ym., 2005, Seal ym., 2006).
<i>RAD51C (radiation sensitive 51C, säteilyherkkä 51C)</i>	<i>RAD51C</i> on osallisena kahdessa kompleksissa; XRCC2:n, <i>RAD51B</i> :n ja <i>RAD51D</i> :n kanssa, sekä XRCC3:n kanssa (Thacker ym., 2005). Nämä kompleksit toimivat DNA-vaurion korjaamisessa, kuten homologisessa rekombinaatiossa sekä geneettisen stabiilisuuden ylläpitämisessä (Smeenk ym., 2010). <i>RAD51C</i> bialleelinen mutaatio on yhdistetty Fanconi anemia-perheisiin (Vaz ym., 2010). <i>RAD51C</i> -geenin monoalleelisten mutaatioiden on havaittu liittyvän perheittäin esiintyvään rinta- ja munasrjasyöpään (Meindl ym., 2010).	Geenin mutaatiot ovat harvinaisia, mutta penetranssi on korkea, vaikkei riskistä ole vielä esitetty lukuarvioita. (Meindl ym., 2010, Claque ym., 2011, Vuorela ym., 2011).

2.2.2 Lievästi kohonneeseen riskiin liittyvät geenit

On arvioitu että lievästi kohonneeseen rintasyöpäriskiin liittyviä genejä on paljon, koska tällä hetkellä tunnetut korkean tai kohtalaisen riskin geenit (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *PTEN*, *CHEK2*, *LKB1*, *PALB2*, *BRIP1* sekä *RAD51C*) vaikuttavat alle 20 %:ssa periytyvistä rintasyövistä (Ford ym., 1995, Newman ym., 1997, Thompson & Easton 2004, Antoniou ym., 2008).

Lievästi kohonneeseen riskiin liitetyt geenivariantit voivat yhdessä muiden geenivarianttien tai ympäristötekijöiden kanssa aiheuttaa syövän kehittymisen. Kuitenkaan toistaiseksi ei vielä tiedetä kuinka suuri osa geneettisistä syistä johtuvista rintasyöpätapauksista on lievästi kohonneen riskin varianttien aiheuttamia ja kuinka paljon sellaisia riskialleeleja on olemassa. (Lichtenstein ym., 2000, Pharoah ym., 2002, Ghossaini ym.). Tällä hetkellä tunnetut lievästi kohonneeseen riskiin liittyvät geenivariantit selittävät noin 9 % perheittäin esiintyvään rintasyöpään liittyvästä riskistä (Ghossaini ym., 2012). Vaikka lievästi kohonneen riskin geenimuutoksiin liittyvä vaara sairastua rintasyöpään on suhteellisen vähäinen, on niiden esiintyminen väestössä yleisempää kuin suuren rintasyöpäalttiuden aiheuttavien geenimuutosten. Sen vuoksi lievästi kohonneen riskin geenivarianttien vaikutus rintasyövän esiintymiseen saattaa olla väestötasolla hyvinkin merkittävä. (Pharoah ym., 2002).

Lievästi kohonneeseen riskiin liittyviä variantteja on löydetty 21 (Easton ym., 2007, Hunter ym., 2007, Stacey ym., 2007, Stacey ym., 2008, Ahmed ym., 2009, Thomas ym., 2009, Zheng ym., 2009, Antoniou ym., 2010, Turnbull ym., 2010, Fletcher ym., 2011, Haiman ym., 2011). Lisäksi Ghossaini ym. tutkimuksessa löydettiin kolme uutta lievästi kohonneeseen riskiin liittyvää varianttia: *PTH1LH*- geenin (parathyroidi hormonin kaltainen hormoni) kanssa samalla kytkentäepätasapainoalueella kromosomissa 12p11 sijaitseva rs10771399, jonka suhteellinen suojaava vaikutus harvinaista alleelia kohti on 0,85 (0,83-0,88, 95 % luottamusväli), kromosomissa 12 alueella q24 sijaitseva rs1292011, jonka suhteellinen riski alleelia kohti on 0,92 (0,91-0,94, 95 % luottamusväli) sekä kromosomissa 21q21 kytkentäepätasapainoalueella, jossa ei ole tunnettuja genejä, sijaitseva rs2823093, jonka suhteellinen suojaava vaikutus harvinaista alleelia kohti on 0,94 (0,92-0,96, 95 % luottamusväli). Tämän variantin lähin geeni on *NR1P1* (tumareseptorin kanssa vuorovaikuttava hormoni 1).

(Ghoussaini ym., 2012). Lisäksi tunnetaan sairastumisriskiä lisääviä variantteja, jotka sijaitsevat kytkenäepätasapainoalueella, jossa ei ole tunnettuja genejä, kuten kromosomissa 8 alueella 24 sijaitseva SNP rs13281615, jonka suhteellinen riski alleelia kohti on 1,08 (1,05-1,11, 95 % luottamusväli) (Easton ym., 2007), kromosomissa 2 alueella 35 sijaitseva rs13387042, jonka suhteellinen riski alleelia kohti on 1,20 (1,13-1,28, 95 % luottamusväli) (Milne ym., 2009). Muutamia lievästi kohonneeseen riskiin liittyviä geenivariantteja on esitelty myös taulukossa 4.

Geenivariantteja, jotka liittyvät lievästi kohonneeseen riskiin, tutkitaan edelleen kiivaasti, koska suvuttain esiintyvistä rintasyövistä jää geneettisesti selittämättä noin 75 % (Easton ym., 1999). Koska nykyisissä tutkimuksissa ei ole pystytty määrittämään enempää korkean riskin genejä, on tultu siihen johtopäätökseen, että riski saada rintasyöpä tulee osittain tai kokonaan suuremmasta määrästä lievästi kohonneeseen riskiin liittyvistä geneistä (Pharoah ym., 2002)

Taulukko 4. Muutamia lievästi kohonneeseen riskiin yhdistettyjä variantteja, geenit joiden alueella ne sijaitsevat sekä suhteellinen rintasyöpäriski alleelia kohti. Mukailtu julkaisun Ghoussaini & Pharoah 2009 mukaan.

Variantti	Geeni/läheinen alue	Suhteellinen riski alleelia kohti (95 % luottamusväli)	Viite
rs2981582	<i>FGFR2</i> (Fibroblast growth factor receptor 2, fibroplasti kasvutekijä reseptori)	1,26 (1,23-1,30)	Easton ym., 2007
rs1219648		1,32 (1,17-1,49)	Hunter ym., 2007
rs3803662	<i>TOX3</i> (TOX high mobility group box family member3)/ <i>LOC643715</i> (locus643714)	1,20 (1,16-1,24)	Easton ym., 2007 Stacey ym., 2007
rs4973768	<i>SLC4A7</i> (solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7, liuoksen kantajageeni perhe 4, natriumbikarbonaatin yhteiskuljettaj, jäsen 7)/ <i>NEK10</i> (never-in mitosis related kinase 1, mitoosiin liittyvä kinaasi, joka ei ole koskaan sisäpuolella 1)	1,11 (1,08-1,13)	Ahmed ym., 2009
rs889312	<i>MAP3KI</i> (mitogen activated protein kinase kinase kinase 1, mitogeenin aktivoima proteiinikinaasi kinaasi kinaasi 1)/ <i>MGC33648</i> (hypothetical protein, hypoteettinen proteiini)/ <i>MIER3</i> (mesoderm induction early response 1, family member 3, mesodermin induction aikainen vaste 1, perheenjäsen 3)	1,13 (1,10-1,16)	Easton ym., 2007
rs2046210	<i>ESR1</i> (estrogen reseptori 1, estrogeenireseptori 1)	1,29 (1,21-1,37)	Zhen gym., 2009
rs13387042	<i>TNP1</i> (transition protein 1, transition proteiini 1)/ <i>IGFBP5</i> (insulin-like growth factor binding protein 5, insuliinin kaltainen kasvutekijään sitoutuva proteiini 5)/ <i>IGFBP52</i> (insulin-like growth factor binding protein 2, insuliinin kaltainen kasvutekijään sitoutuva proteiini 2)/ <i>TNS1</i> (tensin 1, tensiini 1)	1,20 (1,14-1,26)	Stacey ym., 2007
rs13281616	<i>FAM84B</i> (family with sequence similarity 84, member B, perhe, jolla on samankaltainen sekvenssi 84, jäsen B)/ <i>c-MYC</i> (c-myelocytomatosis oncogene, c-myelositytomatoosi onkogeeni)	1,08 (1,05-1,11)	Easton ym., 2007
rs10941679	<i>MRPS30</i> (mitochondrial ribosomal protein S30, mitokondriaalinen ribosomaalinen proteiini S30)/ <i>FGFR10</i> (fibroblast growth factor 10, fibroplasti kasvutekijä 10)	1,19 (1,13-1,26)	Stacey ym., 2007
rs3817198	<i>LSP1</i> (lymphocyte C assembly protein 1, lymfosyytti spesifinen proteiini 1)/ <i>HI9</i>	1,07 (1,04-1,11)	Easton ym., 2007
rs6504950	<i>COX11</i> (cytochrome C assembly protein 11, sytokromi C:n kokoava proteiini 11)/ <i>TOM1L1</i> (target of mybl-like 1, mybl-kaltainen kohde 1)	0,95 (0,92-0,97)	Ahmed ym., 2009
rs1053485	<i>CASP8</i> (caspase 8, kaspasi 8)	0,88 (0,84-0,92)	Cox ym., 2007

2.3 Uusien rintasyöpägeenien etsiminen

Assosiaatiotutkimuksia on käytetty uusien syöpäalleelien etsimiseen yli 30 vuotta ja ymmärtämys yhden geenin vaikutuksen perusteella (monogeenisesti) periytyvistä taudeista on lisääntynyt. Tällä hetkellä haasteena on selvittää monen eri geenin vaikutukseen liittyvien (polygeenisten) tautien molekulaarista ja geneettistä taustaa. Polygeenisten tautien, kuten rintasyövän, geneettisen taustan tutkiminen perustuu mm. geneettisiin assosiaatiotutkimuksiin, joilla voidaan määrittää vähäiseen riskiin liittyviä yleisiä geneettisiä variantteja. (Pharoah ym., 2004)

2.3.1 KytKentäepätasapaino

KytKentä (linkage) liittyy geenien paikkojen (lokusten) välisiin geneettisiin etäisyyksiin. Geenien sijaitessa eri kromosomeissa, niissä olevat alleelijohdistelmät periytyvät toisistaan riippumatta. Jos geenit sijaitsevat samassa kromosomissa mutta kaukana toisistaan, on oletettavaa että niiden alleelit periytyvät myös toisistaan riippumatta, koska meiosisissa niiden väliin muodostuu tekijäinvaihduntoja (crossing over). KytKentän voidaan sanoa olevan olemassa, kun geenit sijaitsevat samassa kromosomissa niin lähellä toisiaan, että niissä olevat tietyt alleelit siirtyvät sukupolvelta toiselle odotettua useammin yhdessä, jolloin syntyy harvoja tekijäinvaihduntojen aiheuttamia rekombinaatioita ja niiden määrä ilmaisee suoraan lokusten välisen geneettisen etäisyyden. (Morton ym., 1956, Botstein ym., 1980, Donis-Keller ym., 1987, Nakamura ym., 1987, Hästbacka ym., 1990, Lehesjoki ym., 1991, Schlessinger ym., 1992, Weissenbach ym., 1992, Ballabio ym., 1993, Sulisalo ym., 1993). KytKentän avulla voidaan määrittää Mendelin periytymissääntöjen mukaisesti periytyvien sairauksien genetiikkaa. Sen avulla voidaan esimerkiksi etsiä korkean riskin aiheuttavia syöpägenejä. (Pharoah ym., 2004).

KytKentäepätasapaino (linkage disequilibrium) tarkoittaa sitä, että läheisten lokusten tietyt alleelit esiintyvät yhdessä useammin kuin voisi olettaa alleelitaajuuksiin perustuvien matemaattisten odotusten mukaan. Tämän voi aiheuttaa kyseisten alleelien toiminnallisesta vaikutuksesta johtuva valinta, mutta suurimmassa osassa tilanteista syynä on eri mekanismi; jos lokukset sijaitsevat tarpeeksi lähellä toisiaan, niiden

tiettyjen alleelien väliin ei ehdi muodostua monienkaan sukupolvien aikana niin paljon rekombinaatioita, että assosiaatio joka oli alussa, purkautuisi täydellisesti. Myöskään alleelit, joita tutkitaan, eivät tällöin esiinny alleelitaajuuksiin perustuvina yhdistelminä tutkittavassa väestössä. (Hästbacka ym., 1992, Malafosse ym., 1992, Lehesjoki ym., 1994).

KytKentäepätasapainokaavioita laskettaessa täytyy arvioida alleelien lokusten etäisyys toisistaan. KytKentäepätasapainoon perustuvan etäisyyksien arvioinnin kannalta on erittäin tärkeää tutkittavan populaation rakenne. Luotettavina voidaan pitää arvioita, jotka perustuvat populaatioon, joka on lähtöisin tarpeeksi pienestä määrästä alkuperäisväestöä (perustajia). Lisäksi on oletettava, että perustajaväestössä esiintyi vain yksi mutaatio ja haplotyyppi. Populaation nykyisen väkiluvun pitää olla tarpeeksi suuri, että tutkittavia tautitapauksia olisi riittävästi. Populaation suurentumisen on täytynyt tapahtua ilman merkittävää muuttoliikettä, sillä se olisi saattanut tuoda populaatioon uusia muita haplotyyppisiä. Lokusten välisen etäisyyden arvioinnin edellytyksenä on se, että populaation laajentumisvaiheen pituus on tiedossa. (Renwick ym., 1955, Lehesjoki ym., 1992, Hästbacka ym., 1993, Kere ym., 1993, Lehesjoki ym., 1993(a), Lehesjoki ym., 1993(b)).

2.3.2 Tapaus-verrokki assosiaatioanalyysi

Assosiaatiotutkimusta käytetään polygeenisten sairauksien tutkimiseen etsittäessä uusia mahdollisia sairastumisriskiin liittyviä geenejä. Assosiaatiotutkimuksessa käytetään tapaus-verrokki koejärjestelyä, jossa on tutkittuun tautiin sairastuneet eli tapaukset ja sairastuneille valitut verrokkit, jotka ovat terveitä, mutta muuten sopivia sairastuneen statukseen. (Risch 2000, Cardon & Bell 2001, Pharoah ym., 2004). Assosiaatioanalyysi perustuu yleensä olettamukselle, että jos geenivariantti on yleinen, on myös tauti yleinen. Jotkut yleisistä geenivarianteista voivat altistaa yleisille taudeille ja näiden geenivarianttien on ehdotettu olevan perustana epäillyille taudille. Assosiaatiokartoitus on hyvä työväline sellaisen lokuksen kartoitukseen, jolla on vähäiset vaikutukset yksinään. (Pharoah ym., 2004).

Assosiaatioanalyysi voi olla joko populaatioon tai perheeseen perustuva. Perheeseen perustuvaa assosiaatiotutkimusta tehdään harvemmin, koska usein on hankalaa saada tutkimukseen mukaan aiempia sukupolvia kuolemantapausten vuoksi. Populaatioon

perustuva tutkimus on yksinkertainen tapaus-verrokki -tutkimus, jossa tutkittavan lokuksen genotyypifrekvenssejä verrataan sellaiseen henkilöön, joka ei ole tutkittavan sukulainen. (Pharoah ym., 2004).

Assosiaatioanalyysiä käytettäessä syöpätutkimuksessa aloitetaan usein kandidaattigeenilähtökohdasta, jolloin tutkittaviksi geeneiksi valikoituvat sellaiset geenit, joiden valmistamat proteiinit, liittyvät usein jollakin tavalla syöpään. Sellaisia proteiineja ovat esimerkiksi apoptoosiin, solusyklin valvomiseen, karsinogeeniaineenvaihduntaan tai DNA:n korjaukseen liittyvät proteiinit. Voidaan myös tutkia sellaisia geenejä, joiden tiedetään olevan somaattisesti muuttuneita syövässä. (Pharoah ym., 2004).

Assosiaatioanalyysissä verrataan esimerkiksi rintasyöpään sairastuneiden geneettisten varianttien frekvenssiä terveiden vertailuhenkilöiden geenifrekvenssiin. Tulosten perusteella on mahdollista saada viitteitä siitä, liittyykö tutkittu geeni rintasyöpään. On mahdollista, että geenin variantti saattaa liittyä rintasyövän kehittymiseen, jos sairastuneiden alleelifrekvenssi eroaa kontrollien alleelifrekvenssistä. Assosiaatioanalyysin avulla saadaan selville riskiin liittyvät variantit, mutta näiden varianttien toiminnalliset vaikutukset on selvitettävä erikseen ennen kuin tiedetään, miten variantti liittyy syöpäriskiin sekä syövän kehittymiseen. Assosiaatioanalyysin tekeminen on helpottunut, koska on opittu tuntemaan paremmin geenien toimintaa ja muutoksia, sekä on kehitetty uusia genotyypin määrittämenetelmiä. (Pharoah ym., 2004).

Koko genomiin perustuvassa assosiaatioanalyysissä markkerien genotyypit määritetään koko genomissa, eikä pelkästään muutamassa kandidaattigeenissä. Koko genomia tutkitaan nykyisin yleensä SNP-markkereiden avulla. On olemassa kaksi yleistä ns. epäsuoraa tapaa, joita käytetään koko genomien tutkimiseen; ensimmäisessä käytetään quasi-random (melkein sattumanvarainen) tai anonyymeja SNP:ja, jotka on valittu koko genomista sattumanvaraisesti tai tietyin emäsvälein siten että SNP:t kattavat koko tutkittavan alueen mahdollisimman hyvin. Toisessa tavassa taas käytetään kytKentäepätasapainokaaviosta valittuja htSNP:ja (haplotype tagging SNP), jotka mahdollistavat koko kytKentäepätasapainoalueen tutkimisen muutaman SNP:n avulla. htSNP:t ovat kytKentäepätasapainossa muiden yksittäisten SNP:ien kanssa, ja siten

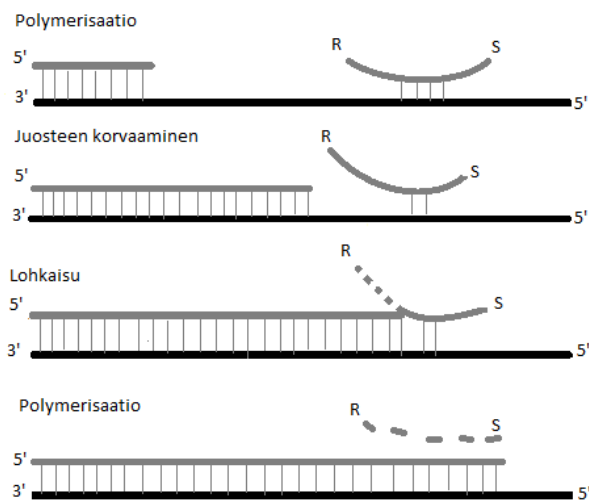
niiden avulla voidaan tutkia koko kytKentäepätasapainoaluetta. Keskittyminen geenialueilla sijaitseviin SNP:n koko genomien assosiaatiotutkimuksissa, saattaisi olla tehokkaampaa kuin nykyisin käytettävät epäsuorat lähestymistavat, joissa SNP:t valitaan siten, että SNP:ja on tasaisesti koko genomien alueelta, koska geneeissä sijaitsevilla varianteilla on suurempi todennäköisyys olla toiminnallisesti tärkeitä kuin geenien ulkopuolella olevilla varianteilla ja geneeissä sijaitsevilla varianteilla on usein pienempi kytKentäepätasapaino, jolloin niitä on vaikeampi havaita käytettäessä epäsuoria lähestymistapoja. Lisäksi geenialueilla sijaitseviin variantteihin keskittyminen saattaisi vähentää genotyypin määrää, koska genotyypin määrittäminen on kallista. (Tabor ym., 2002, Botstein & Risch 2003, Palmer & Cardon, 2005, Smith ym., 2005, Jorgenson & Witte, 2006, Jorgenson & Witte, 2007). Mutta toisaalta taas geenialueilla sijaitseviin variantteihin keskittyminen vähentäisi mahdollisesti sellaisten geenivarianttien löytymistä, jotka sijaitsevat geenialueiden ulkopuolella (Jorgenson & Witte, 2006).

Kandidaattigeeniin perustuvan assosiaatiotutkimuksen ongelmana on mahdollinen vähäinen tietämys kandidaattigeenin proteiinin toiminnasta, jolloin on vaikeampaa tunnistaa kandidaattigeenejä niiden proteiinien toiminnan perusteella (Pharoah ym., 2004). Ideaalitilanteessa yleiset polymorfismit sekä mahdollinen kytKentäepätasapaino selvitettäisiin ensin tutkittavassa populaatiossa. Jonka perusteella voitaisiin selvittää, miten paljon täytyy tutkia eri polymorfismeja, että saadaan selville myös kaikki muut polymorfismit (htSNP:t). Mutta on mahdollista, ettei tutkittu markkeri vastaa oikeaa toiminnallista varianttia, jolloin tällaiset variantit on kuitenkin tutkittava yksitellen. (Pharoah ym., 2004).

2.4 TaqMan-RT-PCR

Kvantitatiivisessa-RT-PCR:ssa (realtime-PCR) monistustuotteiden syntymistä seurataan fluoresoivien väriaineiden avulla jokaisessa sykissä. TaqMan[®] määrittäminen perustuu Taq DNA polymeraasin 5'-3' -eksonukleasiaktiivisuuteen. Jokaisessa reaktiossa on geenispesifiset alukkeet ja fluoresoivat TaqMan[®]-koettimet, jotka sisältävät 5'-reportterin ja 3'-vaimentajan. Reportterina käytetyt fluoresenssivärit ovat usein FAM ja VIC (carboxy fluorescein). Vaimennin voi olla joko fluoresoiva aine tai mikä tahansa sopivalla aallonpituusalueella valoenergiaa absorboiva molekyyli.

Polymerisaatiovaiheessa geenispesifiset alukkeet ja koetin kiinnittyvät tutkittavaan DNA-juosteeseen, ja uusi kaksoisjuoste alkaa muodostua. Samalla kun Taq-polymeraasi tekee templaatille vastinjuostetta, se myös pilkkoo sitoutuneen koettimen. Tämän seurauksena reportteri pääsee kauemmas vaimentimesta ja reportterin fluoresenssisignaali tulee esiin. (kuva 5). DNA:n monistuminen havaitaan fluoresenssin lisääntymisenä. Jos näytteessä ei ole koettimelle sopivaa sitoutumiskohtaa, koetin pysyy liuoksessa ehjänä, ja fluoresenssi pysyy matalana taustasäteilynä. Esimerkiksi kaksialleelisen SNP:n genotyyppien määrittämisessä molemmille alleeleille on omat, eri leimoilla leimatut koettimet (esim. VIC ja FAM). Kun SNP on tutkitussa näytteessä homotsygoottinen, alleelispesifinen koetin sitoutuu ja siihen liittyvä leima (VIC tai FAM) emittoi fluoresenssia. Kun SNP on heterotsygoottinen, molemmat leimat emittoivat reaktiossa omaa fluoresenssiaan. RT-PCR:n etuna perinteiseen PCR:n on se, että, siinä voidaan seurata monistustuotteiden syntyä sekä laatua ja määrää jokaisessa syklissä reaaliajassa.



Kuva 5. TaqMan[®]-RT-PCR-reaktio. R=fluoresoiva reportteri, S=vaimentaja. Kuva mukailtu Centre for proteomic & genomic reasearch (2007) julkaisusta.

2.6 CSE1L/hCAS

CSE1L/hCAS (chromosome segregation 1-like/ cellular apoptosis susceptibility) löydettiin tutkittaessa cDNA fragmentteja, jotka aiheuttavat bakteeritoksiinien indusoimana vastustuskyvyn apoptoosille ihmisen MCF-7 (Michigan Cancer Foundation – 7) rintasyöpäsolulinjassa (Brinkmann ym., 1995a). *CSE1L/hCAS*-

proteiinilla on merkittävä rooli apoptoosissa, koska se toimii mitoosin tarkastuspisteessä ja, jos tarkastuspistettä ei läpäistä, solu ajautuu apoptoosiin (Behrens ym., 2001). Proteiini toimii myös tumastapoiskuljettajana importiini- α :lle (Behrens ym., 2001). *CSE1L*-geeni sijaitsee kromosomissa 20 paikassa q13 (Behrens ym., 2001). Tässä paikassa on tapahtunut monistumista useiden syöpien yhteydessä, kuten rinta-, paksusuolen- ja virtsarakonsyövissä. (Behrens ym., 2001). *CSE1L*-geeni (genominen sekvenssi on 50 649 emästä pitkä, sisältää 25 eksonia) (Brinkmann ym., 1999) on ihmisen homologi hiivan *Cse1*-geenistä, josta muodostuu 971 aminohapon pituinen proteiini (Brinkmann ym., 1995b). Proteiini ohjautuu solulimaan tai tumaan (Brinkmann ym., 1995b). Geenin päätuote (mRNA 3174 emästä) tuottaa 100 kDa kokoisen proteiinin (Brinkmann ym., 1995a).

2.6.2 Proteiinin toiminta

CSE1L/hCAS-proteiinia ilmennetään enemmän erilaistuvissa soluissa, kuten esimerkiksi kiveksissä ja rintakudoksessa (Brinkmann ym., 1995b). *CSE1L/hCAS*-proteiini toimii kahdessa eri tehtävässä nisäkässoluissa: solujen erilaistumisessa sekä apoptoosissa (Brinkmann ym., 1995b). *hCAS* vaikuttaa sekä solujen erilaistumiseen että apoptoosiin, kuljettamalla importiini- α :a pois tumasta (Kutay ym., 1997). Importiinin kierrätys on edellytyksenä monien proteiinien, kuten mitoosiin liittyvien proteiinien, kuljettamiselle tumakalvon läpi. Se kiinnittyy esimerkiksi transkriptiotekijöiden, p53:n sekä *BRCA1*:n proteiinien NLS-sekvenssiin, joka ohjaa ne tumaan (Gallant ym., 1995, Moroianu ym., 1996, Thomas ym., 1996, Middeler ym., 1997, Wang ym., 1997, Kim ym., 2000). *CSE1L*-proteiini liittyy mitoosissa tarvittaviin solurakenteisiin, kuten mikrotubuluksiin (Scherf ym., 1996, Wellmann ym., 1997).

CSE1L toimii mitoosin tarkastuspisteessä, jossa se säätelee kromosomien tarkkaa sijoittumista (Xiao ym., 1993). Mutatoitunut *CSE1L* ei voi hajottaa sykliini-B-proteiinia, jolloin tarkastuspistettä ei läpäistä ja solu ajautuu apoptoosiin, olettaen että *CSE1L* toimii samalla tavalla ihmissoluissa kuin sen homologi *CAS* toimii hiivasoluissa (Ogryzko ym., 1997).

2.6.3 Yhteys syöpään

Jos *hCAS*-geeni ei toimi tai sen toiminta on muuttunut, mittoosin tarkastuspiste ei toimi ja apoptoosia ei tapahdu. Solu voi jatkaa kasvuaan ja jakautumistaan, jolloin syövän kehittyminen on mahdollista. Monissa tutkimuksissa on huomattu, että *CSE1L*:n ilmentyminen syöpäsoluissa liittyy syövän nopeaan kehittymiseen, mutta kuitenkin ei ole vielä ainakaan toistaiseksi olemassa kokeellisia tutkimuksia, joissa voitaisiin näyttää toteen että suurentunut *CSE1L*-geenin ilmentyminen lisää syöpäsolujen erilaistumisen määrää (Wellman ym., 1997, Böni ym., 1999, Behrens ym., 2001, Wellmann ym., 2001, Behrens ym., 2003). *CSE1L*:n korkea ilmentyminen ei voi lisätä kromosomien segregaaation määrää syöpäsolujen jakautumisvaiheessa ja siten lisätä syöpäsolujen proliferaatiota, koska solujen erilaistumisen määrävä vaihe on G1-S-vaihe ja *CSE1L* on yhdistetty mittoottiseen vaiheeseen (Tai ym., 2010). Tutkimuksissa on saatu viitteitä, että lisääntynyt *CSE1L*-proteiinin ilmentyminen ihmisen MCF-7 rintasyöpäsoluissa ei edistänyt solujen erilaistumista, vaan se vähensi erilaistumista sekä lisäsi MMP2 eritystä ja syöpäsolujen invaasiota (Liao ym., 2008). Lisääntynyt *CSE1L*-proteiinin ilmentyminen ei pystynyt myöskään lisäämään ihmisen HT-29 paksusuolen syöpäsolujen, ihmisen Hep G2 hepatokarsinoma solujen, 293 munuaissyöpäsolujen ja hiiren B16-F10 melanoomasolujen leviämistä (Liao ym., 2008). Tulokset osoittivat, että *CSE1L*-proteiinin alentunut määrä tehosti B16-F10 syöpäsolujen invaasiota ja vähensi etäpesäkkeiden muodostusta syöpäsoluissa eläinten etäpesäke tutkimuksissa (Liao ym., 2008).

CSE1L ilmentyminen on lisääntynyt monissa syövässä, kuten imusuoniston kasvaimissa, suolistosyövässä ja pahanlaatuisissa melanoomissa, ja sen korkea ilmentymistaso liittyy korkeaan kasvaimen levinneisyysasteeseen, erilaistumisasteeseen sekä syöpäpotilaan huonompaan ennusteeseen (Brinkmann ym., 1996, Wellmann ym., 2001, Brinkmann, 1998, Böni ym., 1999, Hui ym., 2001, Bar-Shira ym., 2002, Hui ym., 2002, Peiró ym., 2002, Brusstmann, 2004, Tong ym., 2004, Idbaih ym., 2008). Erään tutkimuksen mukaan *CSE1L*-geeni toimii apoptoosia hillitsevänä tekijänä munasarjasyöpäsoluissa, ja sen apoptoosia hillitsevä rooli liittyy apoptoosia edeltävän geenin *RASSF1*:n transkription säätelyyn (Lorenzato ym., 2012). *CSE1L*-geeni valittiin tähän työhön, koska tutkimusryhmämme aikaisemmassa työssä (Hartikainen ym., 2005) löydettiin *CSE1L*-geenin alueelta mikrosatelliittimarkkeri d20s887, jonka

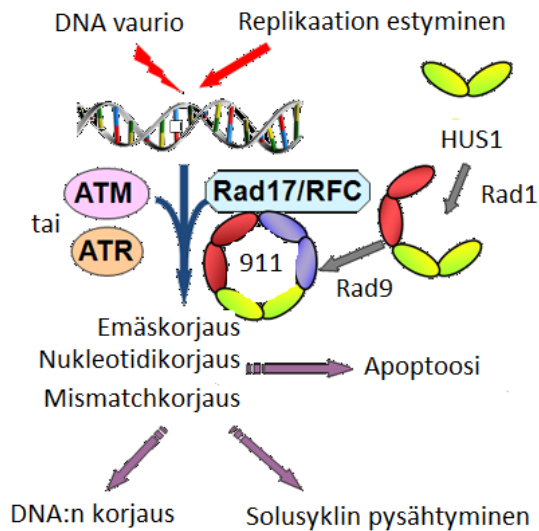
alleelifrekvenssit erosivat tilastollisesti merkitsevästi rintasyöpäpotilaiden ja kontrollien välillä ($p=0,041$), ja siksi haluttiin selvittää rintasyöpäriskiä geeniin liittyen.

2.7 HUS1

HUS1 (Hydroxy urea sensitive 1) löydettiin tutkittaessa geenejä, jotka aiheuttivat herkkyuden genotoksiineille (Enoch ym., 1992). Geeni, joka on 15 464 emäsparia pitkä ja jossa on 8 eksonia, sijaitsee kromosomissa 7, lokuksessa p13-12 (Dean ym., 1998). Geeni tuottaa 280 aminohapon ja 31 691 Da kokoisen proteiinin (Singh ym., 2007).

2.7.1 Proteiinin toiminta

HUS1-proteiini toimii kompleksina RAD1- ja RAD9-proteiinien kanssa DNA-vaurioiden tunnistamisessa tumassa (Volkmer ym., 1999, Caspari ym., 2000, Shiomi ym., 2002, Weiss ym., 2002, Parrilla-Castellar ym., 2004) (kuva 6), mutta voi sijoittua myös solulimaan (Hopkins ym., 2003). Tutkimuksissa hiivalla ja nisäkkäillä on todettu, että RAD9-RAD1-HUS1 -kompleksi (9-1-1-kompleksi) toimii oleellisena osana tarkastuspistesignaloinnin käynnistämässä. Tarkastuspiste pitää yllä genomista tasapainoa (Longhese ym., 1998, Paulovich ym., 1998, Melo ym., 2002, Parrilla-Castellar ym., 2004). On mahdollista että, 9-1-1-kompleksi toimii tunnistajana DNA-vaurioissa, joten se toimii myös CHK1-proteiinin aktivoinnissa vasteena DNA-vauriolle (Parrilla-Castellar ym., 2004). Kun solun sisällä tapahtuu DNA-vaurio, aktivoituu solusyklin tarkastuspiste (G_1/S - tai G_2/M), joka johtaa solusyklin etenemisen pysähtymiseen. Solusyklin eteneminen estää replikaation ja aloittaa DNA-vaurion korjaamisen. (Lukas ym., 2004, Sancar ym., 2004). DNA-vauriolle vasteena, 9-1-1-kompleksi menee vauriokohtaan käynnistäen tarkastuspisteen aktivaation (Zou ym., 2002, Bermudez ym., 2003). Vuorovaikuttamalla monien nukleotidien korjaamiseen, kuten translesiosynteesiin, homologiseen rekombinaatioon sekä mismatch-korjaukseen, osallistuvien tekijöiden kanssa, HUS1 osallistuu myös suoraan DNA:n korjaamiseen (Helt ym., 2005, Guan ym., 2007, He ym., 2008, Gembka ym., 2009).



Kuva 6. HUS1-proteiinin toiminta kompleksina yhdessä Rad1- ja Rad9-proteiinien kanssa (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2012).

2.7.2 Yhteys syöpään

Ylläpitääkseen genomista tasapainoa, solut tarvitsevat tarkkuutta DNA:n kahdentumisessa (replikaatiossa), vastinkromosomien erottumisessa (segregaatiossa) sekä kykyä välttää perinnöllisiä mutaatioita. Kromosomien kahdentuminen on haastava tehtävä, jota voidaan häiritä sisäisillä virheillä kahdentumisessa. Myös ulkopuolelta tulevat tekijät voivat olla häiritseviä tekijöitä aiheuttaen DNA-vaurion. Torjuakseen mahdollisia virheitä solut ovat kehittäneet DNA-korjauksen sekä tarkastuspistemekanismit (esim. G₁- ja G₂-tarkastuspisteet) (Hartwell ym., 1989, Prakash ym., 1993, Friedberg ym., 1995, Elledge 1996, O'Connell ym., 2000, Zhou & Elledge 2000, Hoeijmakers 2001, Nyberg ym., 2002). Virhe näissä mekanismeissa voi johtaa perinnöllisten mutaatioiden kasaantumiseen ja genomisen tasapainon häiriintymiseen, joka on tyypillistä syöpäsoluille (Hartwell ym., 1994, Lengauer ym., 1998, Nyberg ym., 2002). *HUS1*-geenin toiminta liittyy DNA-vaurion tarkastuspisteeseen, jota tarvitaan genomisen stabiilisuuden ylläpitämiseen. Häiriössä tarkastuspiste ei toimi ja vaurioitunut DNA voi replikoitua. Tarkastuspisteen aktivaatio saa usein aikaan apoptoosin, joka tuhoaa vaurioituneen solun (Sancar ym., 2004, Harrison and Haber 2006, Su ym. 2006). Jos *HUS1*-geenin toiminta loppuu tai häiriintyy, DNA:n korjausmekanismin toiminta heikkenee ja DNA:ssa tapahtuvat mutaatiot pääsevät kasaantumaan, jolloin on mahdollista että kehittyy syöpä.

Tutkimusryhmän aikaisemmassa tutkimuksessa etsittiin kromosomialueita mikrosatelliiteilla autosomeista liittyen rintasyöpäriskiä. Työssä tutkittiin 435 autosomeissa sijaitsevaa mikrosatelliittimarkkeria 49 rintasyöpänäytteestä ja 50 kontrollinäytteestä. Tutkimuksessa löydettiin merkitsevä arvo ($p=0,033$) markkereiden d7s519 ($p=0,082$) sekä d7s1818 väliseltä alueelta, jolla myös *HUS1*-geeni sijaitsee. (Hartikainen ym., 2005).

Espanjalaisessa tapaus-verrokkitutkimuksessa selvitettiin 91 geenin yhteyttä rintasyöpään paikallisessa väestössä. Tutkimuksessa löydettiin 25 polymorfismista (yhteensä 640 SNP:a) yhteys rintasyöpään. Näistä kaksi oli *HUS1*-geenin polymorfismit rs1056663 ja rs2708861, jotka liittyivät rintasyöpäriskiä ($p=0,0019$ ja $p=0,0017$). (Vega ym., 2009).

On lisäksi havaittu, että mitä suurempi oli HUS1-proteiinin ilmentymistaso pahanlaatuisessa munasarjasyöpäkasvaimessa, sitä suurempi oli kasvaimen koko ja sitä suurempia olivat *p53*:n sekä *Bax*:n ilmentymistasot. Myös mitoottinen indeksi ja apoptoottinen indeksi olivat sitä suurempia mitä suurempi oli HUS1-proteiinin ilmentymistaso. (de la Torre ym., 2009).

HUS1-geenin polymorfismin rs2708906 ($p=0,0001$) on huomattu liittyvän myös papillaariseen kilpirauhassyöpään. Tutkimuksessa selvitettiin 5077 SNP:a 340 kandidaattigeenin alueelta. *HUS1* oli yksi näistä geenialueista. (Neta ym., 2011).

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää onko *hCAS*- ja *HUS1*-geenien polymorfismeilla vaikutusta rintasyöpäriskiä sekä tutkia onko analysoituilla polymorfismeilla yhteyttä rintasyövän kliinispatologisiin tekijöihin.

4. AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Aineisto

Aineistona tutkimuksessa on otos Kuopion rintasyöpäprojektin näytemateriaalista (Männistö, 1999, Hartikainen ym., 2005).

Kuopion Rintasyöpäprojektin näytteet on kerätty naisilta (yht. 1919), jotka tulivat Kuopion yliopistolliseen sairaalaan (sairaala-alue 750 000 ihmistä) tutkittaviksi rintasyöpäepäilyyn vuosien 1990 ja joulukuun 1995 välisenä aikana. Heistä 516:lla diagnosoitiin histologisesti varmistettu rintasyöpä (ikä 23–91 vuotta) ja 504 osallistui tutkimukseen. Tutkimukseen osallistui 83 % kaikista Kuopion yliopistollisen sairaalan alueella kyseisenä ajanjaksona diagnosoiduista rintasyöpätapauksista eli aineisto on edustava otos (Männistö, 1999). Väestörekisteristä valittiin satunnaisesti yhtä monta verrokkihenkilöä kuin oli tutkimukseen osallistuvia rintasyöpätapauksia, siten että verrokkiryhmä kattoi koko Kuopion yliopistollisen sairaalan alueen. Verrokkihenkilöt pyrittiin valitsemaan jokaiselle rintasyöpätapaukselle siten, että asuinpaikka (kaupunki/maaseutu) ja ikä (± 5 vuotta) olisivat yhteneväiset. (Männistö, 1999).

Kuopion Rintasyöpäprojektin näytteistä on kyselyn avulla määritetty laajat taustatiedot (mm. rintasyöpäepäily suvussa, synnytysten lukumäärä, imetyksen lukumäärä ja kesto, elintavat) ja potilaista on lisäksi kliiniset tiedot. Rintasyöpäpotilailta ja verrokkihenkilöiltä kerättiin EDTA-verinäytteet, joista eristettiin genominen DNA. Jokaiselta osallistujalta pyydettiin kirjallinen lupa. Tutkimuksella on Itä-Suomen yliopiston ja Kuopion Yliopistollisen sairaalan eettisen toimikunnan lupa. (Männistö, 1999). Tässä työssä oli käytettävissä DNA-näytteet 492 potilaasta ja 437 verrokkihenkilöstä.

4.2 Menetelmät

4.2.1 Geenien ja polymorfismien valinta

CSEIL-geeni valittiin tähän työhön, koska tutkimusryhmän aiemmassa työssä löydettiin *CSEIL*-geenin alueelta markkeri d20s887, jonka alleelifrekvenssit erosivat tilastollisesti merkitsevästi rintasyöpäpotilaiden ja kontrollien välillä ($p=0,041$) (Hartikainen ym., 2005). Tutkimuksessa löydettiin assosiaatio myös mikrosatelliittimarkkereihin d7s519 ($p=0,082$) sekä d7s1818 ($p=0,033$). D7S519 ja D7S1818 välinen alue on 3,28 Mb kokoinen ja *HUS1*-geeni sijaitsee tällä alueella noin 1,37 Mb päässä d7s1818:sta (kuva 6). (Hartikainen ym., 2005). Tässä työssä haluttiin selvittää tarkemmin *CSEIL*- ja *HUS1*-geenien yhteyttä rintasyöpäriskiä.

Tässä työssä tutkitut *HUS1*- ja *CSEIL*-geenien SNP-markkerit valittiin käyttämällä HapMap tietokantaa, siten että polymorfismit kattaisivat geenin kytkentäepätasapainoalueet mahdollisimman hyvin sekä harvinaisen alleelin frekvenssi olisi mahdollisimman suuri, jotta näyteaineistossa ilmenisi myös harvinaisen alleelin suhteen homotsygoottista genotyyppiä (kuvat 7 ja 8, taulukko 5).

Kromosomi 7 (p12.3-p12.2)

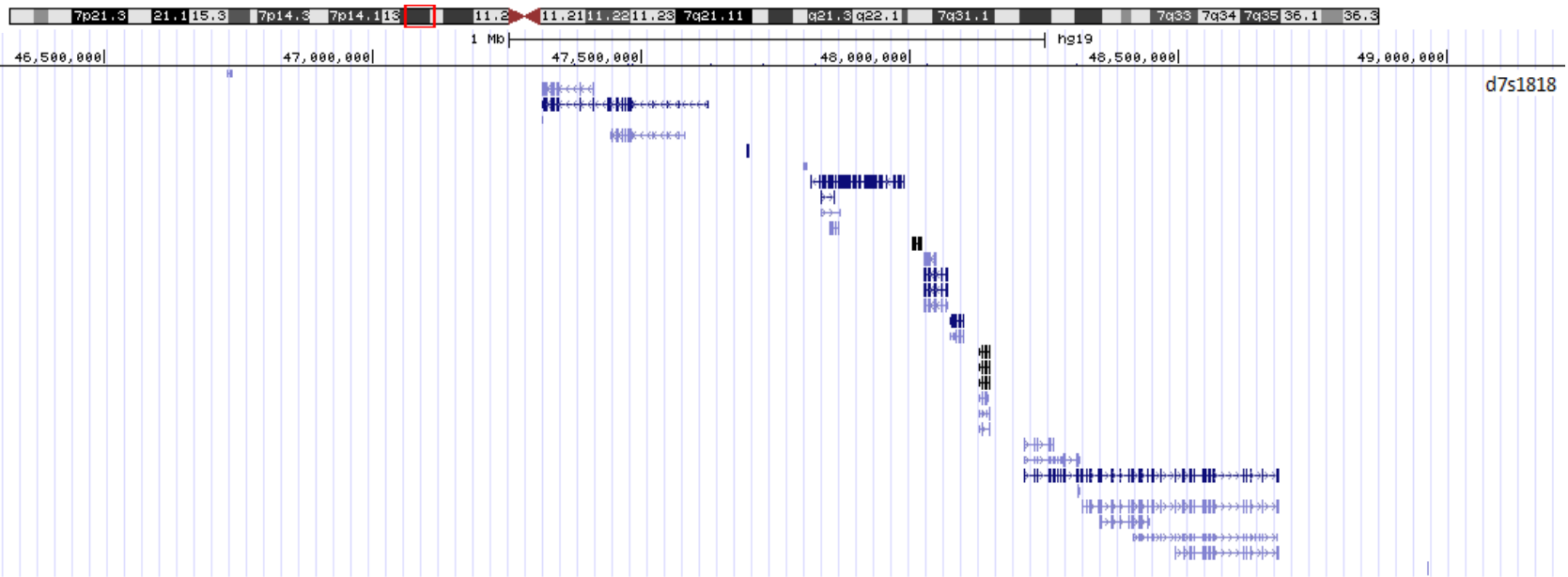
Mitta-asteikko

d7s519

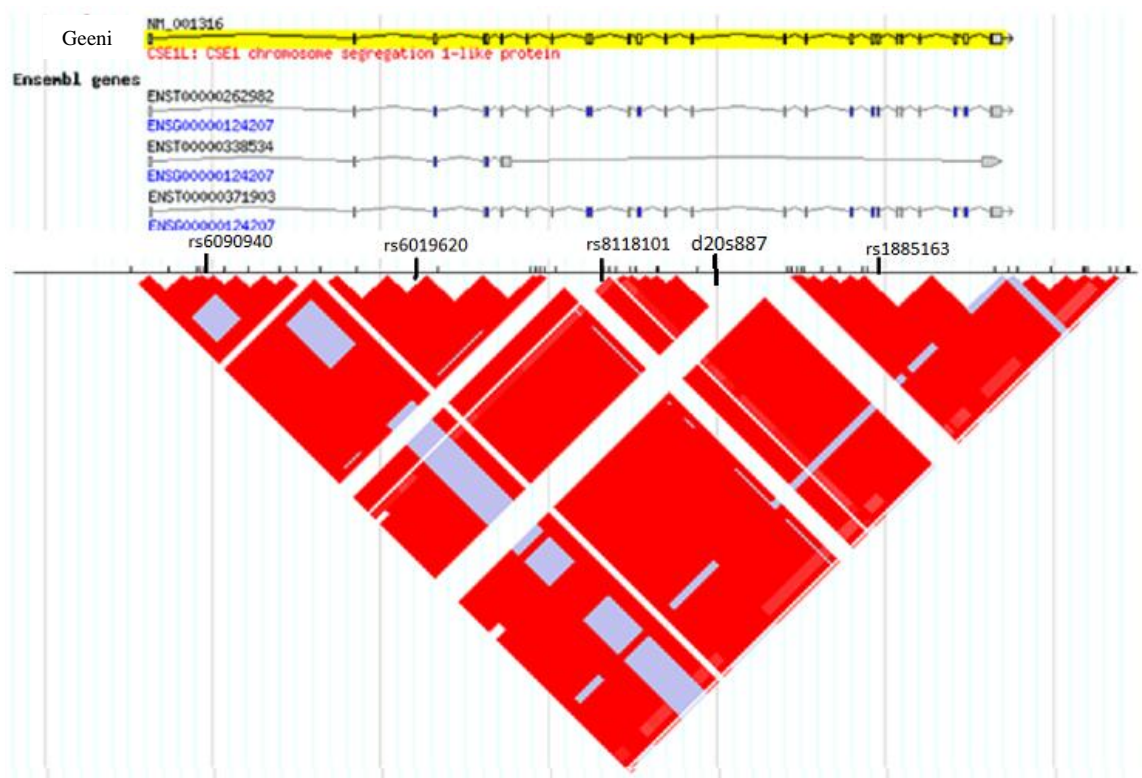
d7s1818

Genit, jotka
sijaitsevat tällä
alueella

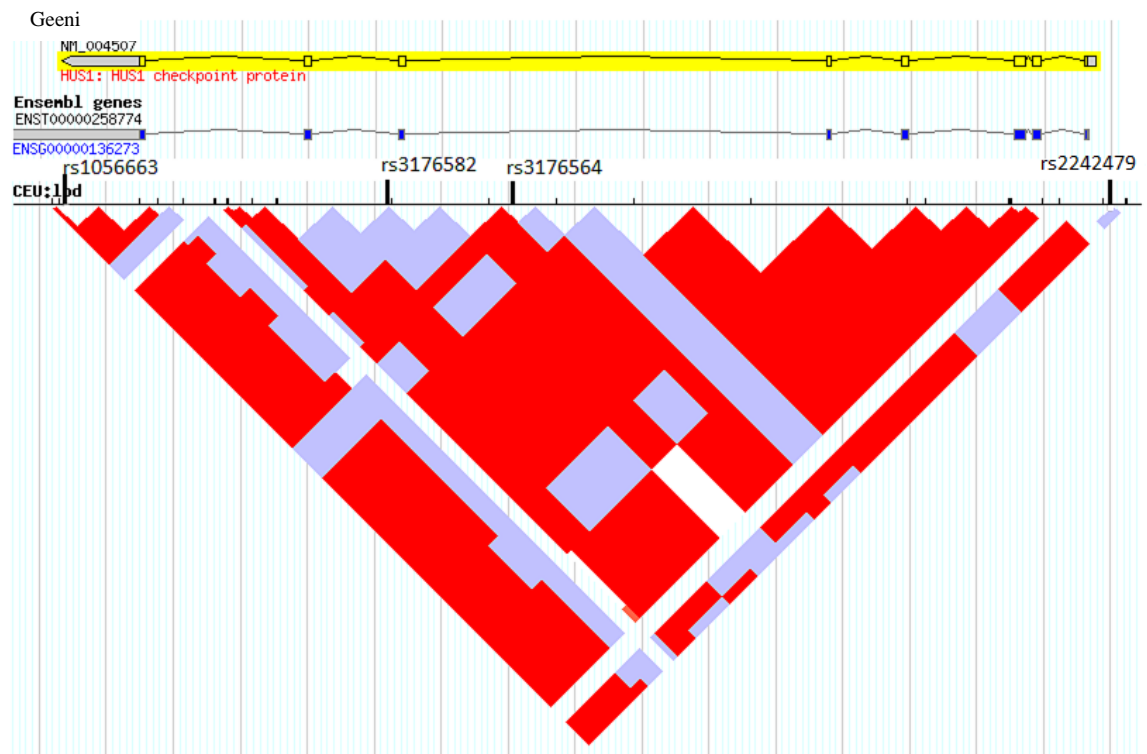
AK125311
TNS3
TNS3
AK310472
TNS3
C7orf65
LINC00525
PKD1L1
C7orf69
C7orf69
PKD1L1
HUS1
SUN3
SUN3
SUN3
SUN3
C7orf57
C7orf57
UPF1
UPF1
UPF1
UPF1
UPF1
UPF1
ABCA13
ABCA13
ABCA13
AX746840
ABCA13
ABCA13
ABCA13
ABCA13
CDC14C



Kuva 6. Kuva 6. Kromosomissa 7, alueella 46,115,995- 49,389,087 sijaitsevien markkereiden d7s519 sekä d7s1818 välinen alue sekä geenit, jotka sijaitsevat kyseisellä alueella (<http://genome.ucsc.edu>, versio Feb. 2009 (GRCh37/hg19)).



Kuva 7. *CSE1L*-geenin kytkentäepätasapainokaavio sekä tutkitut SNP:t sekä Hartikainen ym., 2005 tutkimuksessa löydetty markkeri d20s887 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2012).



Kuva 8. *HUS1*-geenin kytkentäepätasapainokaavio sekä tutkitut SNP:t (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2012).

Taulukko 5. *CSEIL*- ja *HUS1*-geenien tutkitut polymorfismit sekä niiden alleelit, alleelifrekvenssit ja leima TaqMan assayssa.

Polymorfismi	Assaynumero (Applied Biosystems)	Alleelit	Alleelifrekvenssi* (harvinainen alleeli)	Leima TaqMan assayssa
<i>CSEIL</i>				
rs6090940	C_29813559_10	G/T	T: 0,3315	G=VIC, T=FAM
rs8118108	C_1844693_10	C/A	A: 0,3301	C=VIC, T=FAM
rs1885163	C_11660897_1_	T/C	C: 0,3045	T=FAM, C=VIC
rs6019620	C_1844684_10	T/A	A: 0,3310	T=FAM, A=VIC
<i>HUS1</i>				
rs1056663	C_1825446_20	G/A	A: 0,4570	G=VIC, T=FAM
rs2242479	C_1825418_1_	T/A	A: 0,4725	T=FAM, A=VIC
rs3176564	C_1825427_10	T/C	C: 0,4725	T=VIC, C=FAM
rs3176582	C_1825435_10	C/T	T: 0,1470	G=FAM, T=VIC

* NCBI SNP database, 1000Genomes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), 10.10.2012

4.2.2 Genotyypin määrittäminen

Tutkittavista näytteistä määritettiin *CSEIL*-geenin SNP:ien rs1885163, rs6090940, rs6019620 ja rs8118101 sekä *HUS1*-geenin SNP:ien rs1056663, rs2242479, rs3176564 ja rs3176582 genotyypit 5' nukleasi TaqMan[®]-menetelmällä (Applied Biosystems). Määrittämiseen käytettiin TaqMan[®] SNP Genotyping Assay -reagensseja (Applied Biosystems), johon kuului kahdelle alleelille spesifiset koettimet ja PCR alukkeet (taulukko 5). Määrittäminen tehtiin Mx3000P Real-Time PCR-laitteella (Stratagene). Näytteet (19 ng DNA:ta, 4 ng/ µl) jaettiin valmiiksi 96-kuoppalevyille. Kuoppiin lisättiin reaktioseos, joka sisälsi 2xMMix:n (TaqMan[®] Genotyping MasterMix, lot. 0801015, Applied Biosystems) ja 40x TaqMan[®] SNP Genotyping Assay Mix:n (Applied Biosystems). Reaktiokokonaistilavuus oli 10 µl. Jokaisella kuoppalevyllä oli mukana neljä NTC-kontrollia (No template control, ei sisältänyt DNA:ta), jotka toimivat kontrollina reaktiokokonaistilavuuden epäpuhtauksien varalta. Ohjelma RT-PCR-laitteella oli 2 minuuttia 50 °C:ssa, 10 minuuttia 95 °C:ssa, jonka jälkeen 55-65 sykliä 15 sekuntia 92 °C:ssa ja 1 minuutti 60 °C:ssa.

Fluoresenssikuvauksista saaduista arvoista määritettiin genotyypit MxPro-Mx3000P v3.01 -ohjelmalla. Näytteiden genotyypit kerättiin yhteen jokaisen SNP:n osalta ja niitä analysoidiin tilastollisesti.

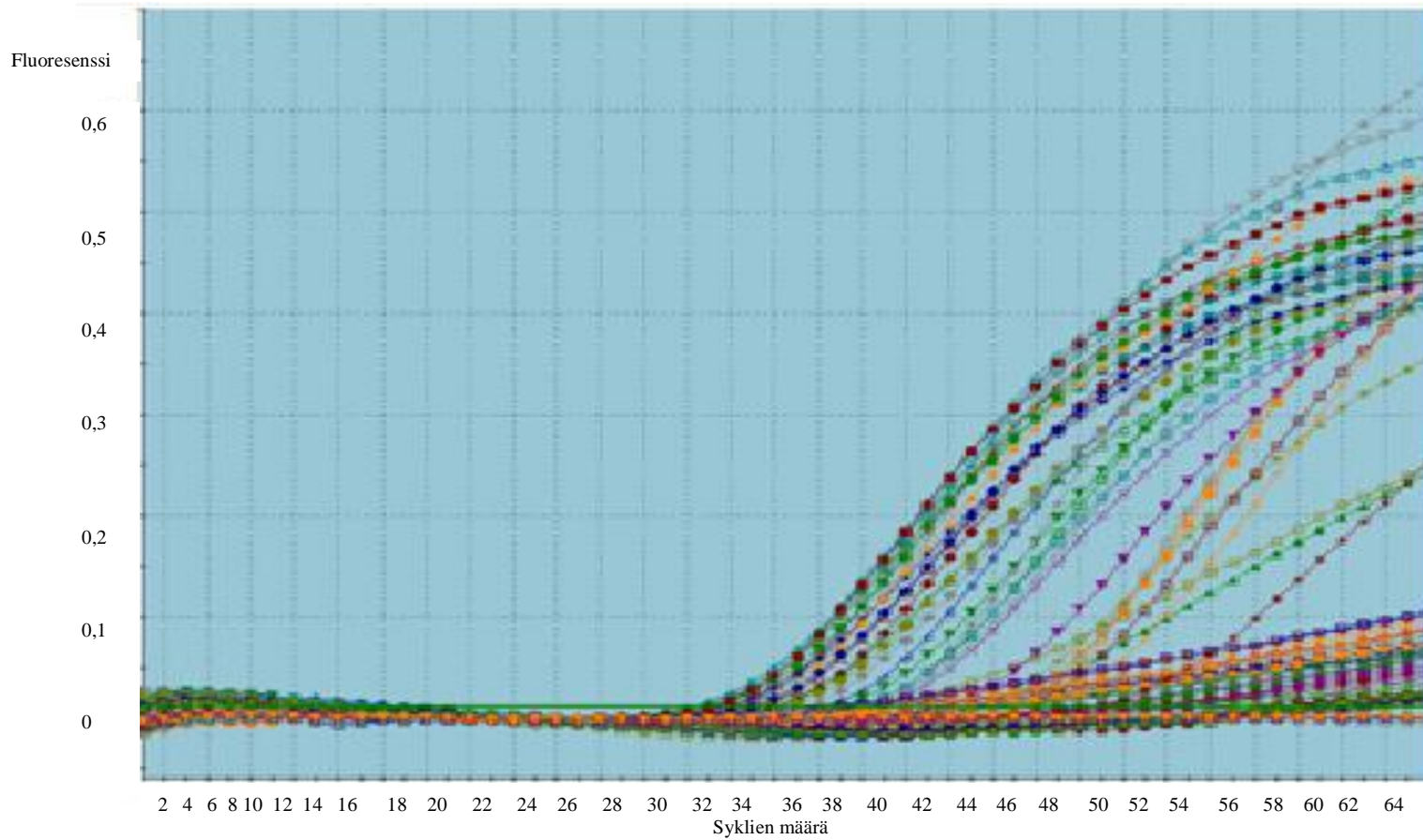
4.2.3 Tilastollinen arviointi

Tulosten tilastollisiin arviointeihin käytettiin SPSS 14.0 For Windows- ohjelmaa (SPSS, Chicago, IL). Genotyyppien yhteyttä rintasyöpäriskiin tutkittiin vertailemalla genotyyppifrekvenssejä rintasyöpäpotilaiden ja verrokkihenkilöiden välillä χ^2 -testillä. Rintasyöpää sairastavilta tutkittiin myös genotyypin ja kliinispatologisten muuttujien (kasvaimen koko, levinneisyysaste, kudostyyppimäärittäminen, erilaistumisaste, estrogeenireseptoristatus, progesteronireseptoristatus sekä HER2-reseptoristatus) yhteyttä χ^2 -testillä. Tilastollisesti merkitsevänä pidettiin tulosta, jonka p-arvo oli $\leq 0,05$. Genotyyppien tasapainoa arvioitiin määrittämällä Hardy-Weinberg tasapaino χ^2 -testillä.

5. TULOKSET

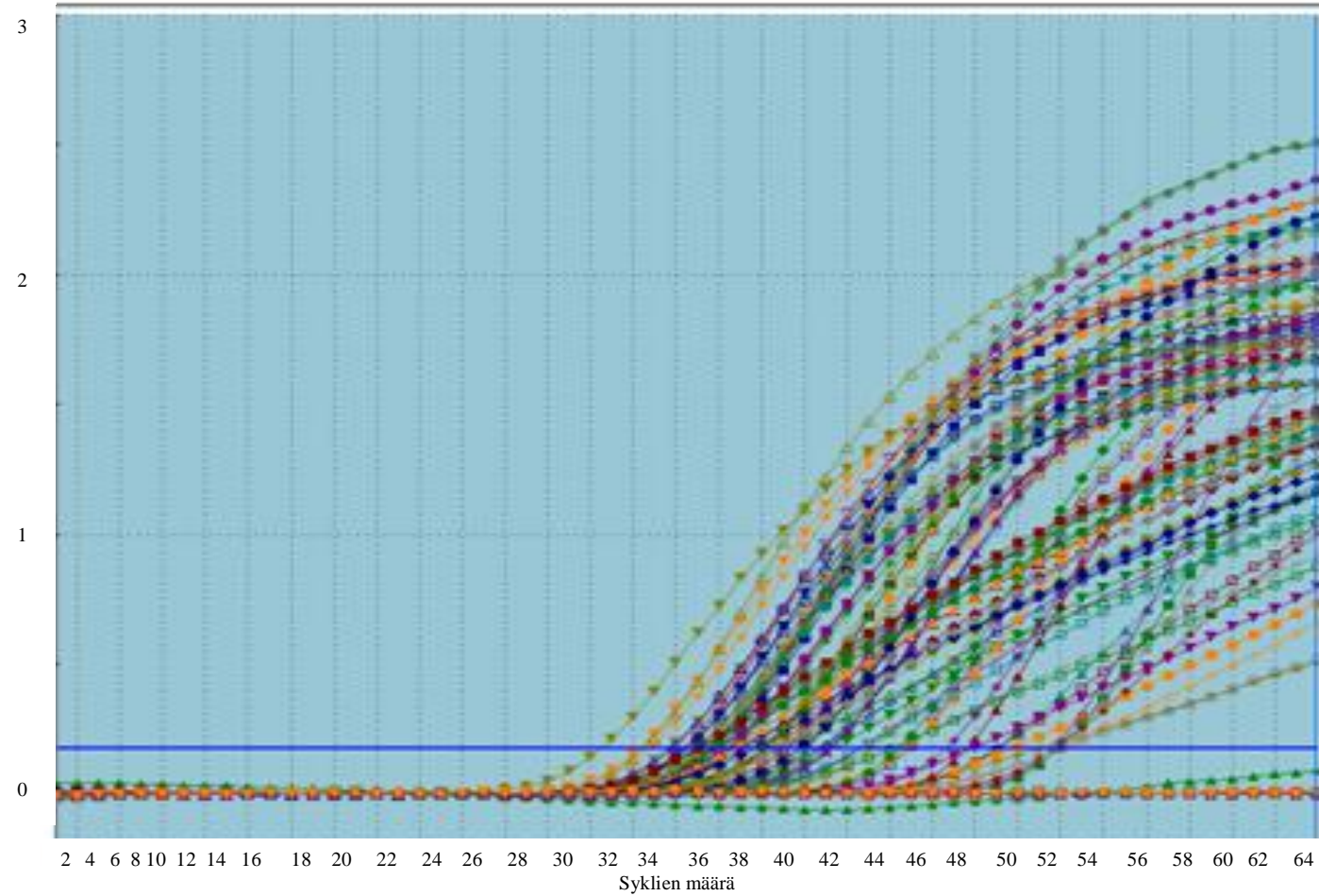
5.1 RT-PCR

QPCR-reaktiossa saatiin tuloksena sitoutuneen ja pilkkoutuneen koettimen fluoresenssin määrän kuvaajat. Esimerkkinä *CSEIL*-geenin SNP rs1885163 fluoresenssit eri leimoilla; VIC (kuva 9) ja FAM (kuva 10). Fluoresenssien perusteella määritettiin MxPro-Mx3000P v3.01 -ohjelmalla mitä genotyyppiä näytteet olivat. QPCR-reaktiosta saaduista genotyypeistä on esimerkiksi *HUS1*-geenin SNP rs1056663 (kuva 11). *CSEIL*-geenin SNP rs6019620 jätettiin pois analyysistä, koska se ei toiminut QPCR:ssä. Testatuille genotyypeille tehtiin Hardy-Weinberg-equilibrium-testi, ja kaikki genotyypit olivat Hardy-Weinberg-tasapainossa.

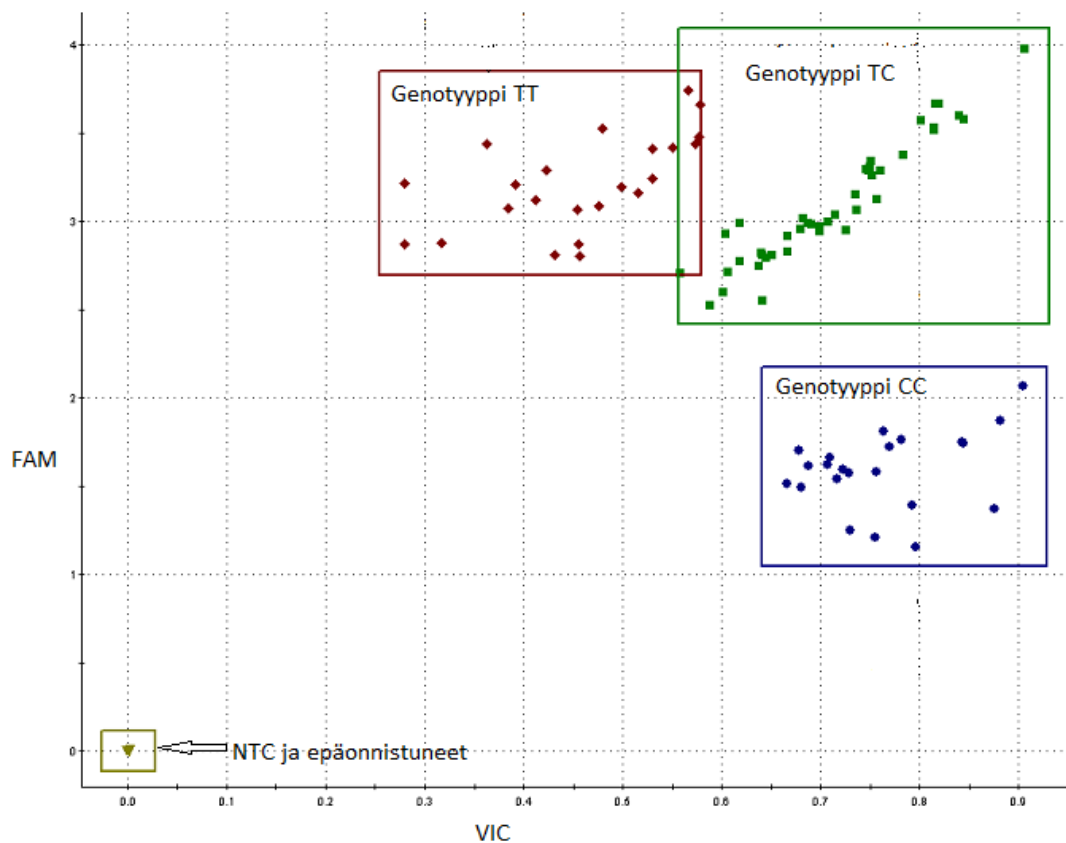


Kuva 9. QPCR-reaktion näytteiden fluoresenssin määrät *CSEIL*-geenin SNP rs1885163 (VIC-leima). Pystyakselilla on fluoresenssin määrä ja vaaka-akselilla on syklien määrä.

Fluoresenssi



Kuva 10. QPCR-reaktion näytteiden fluoresenssin määrät *CSEIL*-geenin SNP rs1885163 (FAM-leima). Pystyakselilla on fluoresenssin määrä ja vaaka-akselilla on syklien määrä.



Kuva 11. QPCR-reaktiosta saadut näytteiden genotyypit. *HUS1*-geenin SNP rs1056663.

5.2 Tilastolliset arvioinnit

5.2.1 Rintasyöpäriski

HUS1- ja *CSE1L*-geenien eri polymorfismien genotyyppifrekvenssejä verrattiin rintasyöpäpotilaiden ja verrokkien välillä. Genotyypit jaettiin vertailuissa kolmeen luokkaan, jossa kaikki genotyypit ovat omana luokkana (taulukko 6) sekä kahteen luokkaan, jossa genotyypit on jaettu ryhmiin siten, että yleinen homotsygootti on omana ryhmänään ja heterotsygootti sekä harvinainen homotsygootti muodostavat yhden ryhmän (taulukko 7). Genotyyppien ollessa kolmena luokkana *HUS1*-geenin polymorfismeilla rs1056663 (p-arvo 0,005) sekä rs2242479 (p-arvo 0,011) huomattiin olevan yhteys rintasyöpäriskiä (taulukko 6). Genotyyppien ollessa kahtena luokkana ei huomattu polymorfismeilla olevan yhteyttä rintasyöpäriskiä (taulukko 7).

Taulukko 6. *HUS1*- ja *CSEIL*- geenien polymorfismien eri genotyyppien liittyminen rintasyöpäriskiin. Genotyypit kolmena luokkana (χ^2 -testi, 99 %-luottamusväli).

Geeni	SNP	Genotyyppi	Genotyyppien lukumäärä		p-arvo	Alleelifrekvenssit
			Potilas (%)	Verrokki (%)		
<i>HUS1</i>						
rs1056663		TT	156 (38 %)	120 (33 %)	0,005	T=0,595 C=0,405
		TC	202 (49 %)	166 (46 %)		
		CC	52 (13 %)	77 (21 %)		
		Yhteensä	410	363		
rs3176582		CC	303 (67 %)	250 (65 %)	0,856	C=0,818 T=0,182
		CT	139 (31 %)	121 (32 %)		
		TT	11 (2 %)	11 (3 %)		
		Yhteensä	453	382		
rs2242479		AA	165 (39 %)	128 (35 %)	0,011	A=0,604 T=0,396
		AT	203 (48 %)	160 (44 %)		
		TT	54 (13 %)	76 (21 %)		
		Yhteensä	422	364		
rs3176564		GG	176 (40 %)	129 (35 %)	0,375	G=0,620 A=0,380
		GA	212 (48 %)	180 (50 %)		
		AA	56 (13 %)	55 (15 %)		
		Yhteensä	444	364		
<i>CSEIL</i>						
rs8118101		CC	263 (64 %)	213 (68 %)	0,312	C=0,805 T=0,195
		CT	130 (32 %)	82 (26 %)		
		TT	19 (4 %)	16 (6 %)		
		Yhteensä	412	311		
rs6090940		GG	242 (54 %)	189 (51 %)	0,403	G=0,725 T=0,275
		GT	169 (38 %)	158 (42 %)		
		TT	36 (8 %)	26 (7 %)		
		Yhteensä	447	373		
rs1885163		TT	252 (56 %)	208 (57 %)	0,951	T=0,743 C=0,257
		TC	160 (36 %)	126 (35 %)		
		CC	36 (8 %)	30 (8 %)		
		Yhteensä	448	364		

Taulukko 7. *HUS1*- ja *CSEIL*- geenien polymorfismien eri genotyyppien liittyminen rintasyöpärisiin. Genotyypit kahtena luokkana (χ^2 -testi, 99 %-luottamusväli).

Geeni	SNP	Genotyyppi	Genotyyppien lukumäärä		p-arvo
			Potilas (%)	Verrokki (%)	
<i>HUS1</i>	rs1056663	TT	156 (38 %)	120 (33 %)	0,154
		TC+CC	254 (62 %)	243 (67 %)	
		Yhteensä	410	363	
	rs3176582	CC	303 (67 %)	250 (65 %)	0,660
		CT+TT	150 (33 %)	132 (35 %)	
		Yhteensä	453	382	
	rs2242479	AA	165 (39 %)	128 (35 %)	0,268
		AT+TT	257 (61 %)	236 (65 %)	
		Yhteensä	422	364	
	rs3176564	GG	176 (40 %)	129 (35 %)	0,243
		GA+AA	268 (60 %)	235 (65 %)	
		Yhteensä	444	364	
<i>CSEIL</i>	rs8118101	CC	263 (64 %)	213 (68 %)	0,205
		CT+TT	149 (36 %)	98 (32 %)	
		Yhteensä	412	311	
	rs6090940	GG	242 (54 %)	189 (51 %)	0,327
		GT+TT	205 (46 %)	184 (49 %)	
		Yhteensä	447	373	
	rs1885163	TT	252 (56 %)	208 (57 %)	0,831
		TC+CC	196 (44 %)	156 (43 %)	
		Yhteensä	448	364	

5.2.2 Kliiniset muuttujat

HUS1:n ja *CSEIL*:n eri polymorfismien yhteyttä kliinisiin ennustetekijöihin arvioitiin genotyyppien ollessa kolmena luokkana (harvinainen homotsygootti, yleinen homotsygootti, heterotsygootti) (taulukot 8 ja 9). *HUS1*-geenin polymorfismeilla rs1056663, rs2242479 sekä rs3176564 huomattiin olevan yhteys HER2:een (p-arvot järjestyksessä: p=0,005, p=0,002, p=0,001) (taulukot 8 ja 9). *HUS1*-geenin polymorfismin rs3176582 huomattiin olevan yhteydessä kasvaimen kokoon (p=0,049) sekä levinneisyysasteeseen (p=0,050) (taulukko 8).

Taulukko 8. *HUS1*-geenin polymorfismien rs1056663 ja rs2242479 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kolmena luokkana (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs1056663			p-arvo	rs2242479			p-arvo
	n				n			
	TT	TC	CC		AA	AT	TT	
Kasvaimen koko				0,782				0,824
T1	72	95	27		80	97	23	
T2	64	77	19		63	73	24	
T3&T4	10	23	4		11	22	5	
Levinneisyysaste				0,930				0,645
I	54	68	20		62	72	16	
II	71	101	24		69	93	28	
III+IV	15	24	5		16	25	7	
Kudostyyppimäärittäminen				0,543				0,462
Duktaalinen	93	123	34		99	117	38	
Lobulaarinen	26	34	12		28	39	10	
Muut	27	38	4		27	36	4	
Erilaistumisaste				0,296				0,273
I	37	53	13		36	54	11	
II	62	98	21		67	94	26	
III	46	43	16		50	43	15	
Estrogeenireseptoristatus				0,131				0,080
Negatiivinen	36	38	16		37	34	16	
Positiivinen	103	152	33		109	153	35	
Progesteronireseptoristatus				0,503				0,463
Negatiivinen	56	65	20		58	63	21	
Positiivinen	83	123	29		88	122	30	
HER2 status				0,005				0,002
Negatiivinen	117	157	34		122	162	36	
Positiivinen	19	18	14		22	14	13	

Taulukko 9. *HUS1*-geenin polymorfismien rs3176564 ja rs3176582 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kolmena luokkana (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs3176564			p-arvo	rs3176582			p-arvo
	n				n			
	GG	GA	AA		GG	GA	AA	
Kasvaimen koko				0,964				0,049
T1	85	101	27		142	68	9	
T2	68	79	22		122	48	1	
T3&T4	12	21	5		20	18	1	
Levinneisyysaste				0,919				0,050
I	64	76	20		111	46	8	
II	77	101	27		141	64	2	
III+IV	17	22	6		25	21	1	
Kudostyyppimääritys				0,570				0,307
Duktaalinen	103	126	38		188	76	9	
Lobulaarinen	31	35	11		50	29	0	
Muut	31	40	5		46	29	2	
Erilaistumisaste				0,163				0,802
I	40	57	12		72	37	3	
II	70	100	26		128	65	6	
III	54	43	16		82	32	2	
Estrogeenireseptoristatus				0,197				0,650
Negatiivinen	40	39	16		59	34	2	
Positiivinen	117	157	37		213	98	9	
Progesteronireseptoristatus				0,670				1,000
Negatiivinen	63	69	21		102	49	4	
Positiivinen	94	125	32		170	81	7	
HER2 status				0,001				0,475
Negatiivinen	132	171	38		234	105	8	
Positiivinen	21	15	14		32	18	2	

HUS1-geenin yhteyttä kliinisiin muuttujiin arvioitiin genotyyppien ollessa kahtena luokkana (yleinen homotsygootti sekä harvinainen homotsygootti+heterotsygootti). *HUS1*-geenillä ei huomattu olevan yhteyttä kliinisiin muuttujiin genotyyppien ollessa kahtena luokkana (taulukot 10 ja 11).

Taulukko 10. *HUS1*-geenin polymorfismien rs1056663 ja rs2242479 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kahtena luokkana (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs1056663		p-arvo	rs2242479		p-arvo
	n			n		
	TT	TC+CC		AA	AT+TT	
Kasvaimen koko			0,879			0,403
T1	54	88		62	88	
T2	71	125		69	121	
T3&T4	15	18		16	32	
Levinneisyysaste			0,529			0,670
I	72	122		80	120	
II	64	96		63	97	
III+IV	10	27		11	27	
Kudostyyppimäärittäminen			0,778			0,549
Duktaalinen	93	157		99	155	
Lobulaarinen	26	46		28	49	
Muut	27	42		27	40	
Erilaistumisaste			0,258			0,170
I	37	66		36	65	
II	62	119		67	120	
III	46	59		50	58	
Estrogeenireseptoristatus			0,626			0,303
Negatiivinen	36	54		37	50	
Positiivinen	103	185		109	188	
Progesteronireseptoristatus			0,283			0,312
Negatiivinen	56	85		58	84	
Positiivinen	83	152		88	152	
HER2 status			1,000			0,432
Negatiivinen	117	191		122	198	
Positiivinen	19	32		22	27	

Taulukko 11. *HUS1*-geenin polymorfismien rs3176564 ja rs3176582 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kahtena luokkana (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs3176564		p-arvo	rs3176582		p-arvo
	n			n		
	GG	GA+AA		GG	GA+AA	
Kasvaimen koko			0,824			0,139
T1	64	96		111	54	
T2	77	128		141	66	
T3&T4	13	18		19	13	
Levinneisyysaste			0,785			0,092
I	85	128		142	77	
II	68	101		122	49	
III+IV	12	26		20	19	
Kudostyyppimääritys			0,584			0,429
Duktaalinen	103	164		188	85	
Lobulaarinen	31	46		50	29	
Muut	31	45		46	31	
Erilaistumisaste			0,098			0,464
I	40	69		72	40	
II	70	126		128	71	
III	54	59		82	34	
Estrogeenireseptoristatus			0,446			0,425
Negatiivinen	40	55		59	36	
Positiivinen	117	194		213	107	
Progesteronireseptoristatus			0,480			0,268
Negatiivinen	63	90		102	53	
Positiivinen	94	157		170	88	
HER2 status			0,646			0,432
Negatiivinen	132	209		234	113	
Positiivinen	21	29		32	20	

CSEIL-geenin yhteyttä arvioitiin kliinisiin muuttujiin genotyyppien ollessa kolmena luokkana (harvinainen homotsygootti, yleinen homotsygootti, heterotsygootti) (taulukot 12 ja 13). *CSEIL*-geenin polymorfismin rs8118101 ($p=0,045$) huomattiin olevan yhteydessä levinneisyysasteeseen (taulukko 12). Muilla polymorfismeilla ei löytynyt yhteyttä kliinisiin muuttujiin.

Taulukko 12. *CSEIL*-geenin polymorfismien rs8118101 ja 1885163 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kolmena luokkana. (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs8118101			p-arvo	rs1885163			p-arvo
	n				n			
	CC	CT	TT		TT	TC	CC	
Kasvaimen koko				0,065				0,107
T1	94	42	8		89	53	18	
T2	121	68	5		118	77	11	
T3&T4	28	10	5		27	14	7	
Levinneisyysaste				0,045				0,316
I	129	59	9		98	64	15	
II	95	57	6		81	59	10	
III+IV	23	9	3		19	10	4	
Kudostyyppimäärittys				0,307				0,837
Duktaalinen	159	81	9		135	87	17	
Lobulaarinen	42	26	3		29	23	6	
Muut	46	18	6		34	23	6	
Erilaistumisaste				0,651				0,802
I	71	29	4		57	32	6	
II	112	59	7		88	62	13	
III	64	36	7		53	37	10	
Estrogeenireseptoristatus				0,748				0,422
Negatiivinen	59	24	4		46	22	5	
Positiivinen	184	92	14		149	103	22	
Progesteronireseptoristatus				0,456				0,166
Negatiivinen	96	40	5		77	42	6	
Positiivinen	145	76	13		116	83	21	
HER2 status				0,530				0,897
Negatiivinen	205	96	13		164	109	21	
Positiivinen	30	18	3		22	17	3	

Taulukko 13. *CSEIL*-geenin polymorfismin rs6090940 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kolmena luokkana. (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs6090940			p-arvo
	GG	GT	TT	
Kasvaimen koko				0,308
T1	86	59	16	
T2	113	79	13	
T3&T4	27	14	6	
Levinneisyysaste				0,531
I	117	79	18	
II	92	66	13	
III+IV	21	13	14	
Kudostyyppimääritys				0,679
Duktaalinen	150	100	18	
Lobulaarinen	40	30	9	
Muut	40	28	8	
Erilaistumisaste				0,360
I	69	36	6	
II	101	77	17	
III	60	43	12	
Estrogeenireseptoristatus				0,157
Negatiivinen	58	27	9	
Positiivinen	167	124	24	
Progesteronireseptoristatus				0,155
Negatiivinen	94	49	11	
Positiivinen	129	102	22	
HER2 status				0,391
Negatiivinen	190	130	23	
Positiivinen	26	19	6	

CSEIL-geenin yhteyttä arvioitiin kliinisiin muuttujiin genotyyppien ollessa kahtena luokkana (yleinen homotsygootti sekä harvinainen homotsygootti+heterotsygootti) (taulukot 14 ja 15). *CSEIL*-geenin polymorfismilla rs8118101 (p-arvo=0,049) huomattiin olevan yhteys levinneisyysasteeseen (taulukko 14).

Taulukko 14. *CSEIL*-geenin polymorfismien rs8118101 ja rs1885163 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kahtena luokkana (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs8118101		p-arvo	rs1885163		p-arvo
	n			n		
	GG	GA+AA		GG	GA+AA	
Kasvaimen koko			0,722			0,799
T1	94	50		89	71	
T2	121	73		118	88	
T3&T4	18	12		17	16	
Levinneisyysaste			0,049			0,102
I	129	68		124	90	
II	95	63		92	79	
III+IV	23	12		22	17	
Kudostyyppimäärittely			0,668			0,632
Duktaalinen	159	90		157	115	
Lobulaarinen	42	29		42	35	
Muut	46	24		39	36	
Erilaistumisaste			0,428			0,458
I	71	33		68	43	
II	112	66		105	88	
III	64	43		64	54	
Estrogeenireseptoristatus			0,598			0,816
Negatiivinen	59	28		58	37	
Positiivinen	184	106		175	140	
Progesteronireseptoristatus			0,430			0,745
Negatiivinen	96	45		92	62	
Positiivinen	145	89		139	115	
HER2 status			0,431			0,174
Negatiivinen	205	109		198	145	
Positiivinen	30	1		24	27	

Taulukko 15. *CSEIL*-geenin polymorfismin rs6090940 yhteys kliinisiin muuttujiin, genotyyppien ollessa kahtena luokkana (χ^2 -testi, 99 % -luottamusväli).

Kliininen muuttuja	rs6090940		p-arvo
	n		
	GG	GA+AA	
Kasvaimen koko			0,908
T1	86	75	
T2	113	92	
T3&T4	18	15	
Levinneisyysaste			0,513
I	117	97	
II	92	79	
III+IV	21	17	
Kudostyyppimäärittäminen			0,835
Duktaalinen	150	118	
Lobulaarinen	40	39	
Muut	40	36	
Erileistumisaste			0,186
I	69	42	
II	101	94	
III	60	55	
Estrogeenireseptoristatus			0,517
Negatiivinen	58	36	
Positiivinen	167	148	
Progesteronireseptoristatus			0,198
Negatiivinen	94	60	
Positiivinen	129	124	
HER2 status			0,651
Negatiivinen	190	153	
Positiivinen	26	25	

6. POHDINTA

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä teollistuneissa maissa ja Suomessa jopa joka yhdeksäs nainen sairastuu siihen elämänsä aikana (Suomen syöpärekisteri, 2010). Tässä tutkimuksessa selvitettiin *hCSEIL/CAS*- ja *HUS1*-geenien mahdollista liittymistä rintasyöpäriskiin. Työssä tutkittiin myös näiden geenien eri polymorfismien yhteyttä kliinis-patologisiin tekijöihin. Aiemmassa tutkimuksessa havaittiin että *HUS1* ja *CSEIL* saattaisivat olla matalan riskin rintasyövän kandidaattigeenejä (Hartikainen ym., 2005).

HUS1-geeniä ei ole juurikaan tutkittu mahdollisena rintasyövän matalan riskin geenivarianttina. Kirjallisuudessa on yksi tutkimus, jossa on löydetty matalaan riskiin viittaavia tuloksia (Vega ym., 2008). *CSEIL*-geeniä on tutkittu hieman rintasyöpään liittyen, mutta mahdollisena rintasyövän matalaan riskiin liitettyä geenivarianttina sitä ei ole tutkittu (Behrens ym., 2001, Tai ym., 2010). *CSEIL* ilmentymisen on huomattu lisääntyneen monissa syövissä ja sen korkea ilmentymistaso liittyy korkeaan kasvaimen levinneisyysasteeseen, erilaistumisasteeseen sekä syöpäpotilaan huonompaan ennusteeseen (Brinkmann ym., 1996, Böni ym., 1999, Hui ym., 2001, Bar-Shira ym., 2002, Hui ym., 2002, Peiró ym., 2002, Brusstmann, 2004, Tong ym., 2004, Fangym., 2005, Oullet ym., 2006, Idbaih ym., 2008).

Tässä tutkimuksessa saatiin viitteitä siitä, että *HUS1*-geenin polymorfismeilla rs1056663 (p-arvo 0,005) sekä rs2242479 (p-arvo 0,011) näyttäisi olevan yhteys rintasyöpäriskiin. Mutta sitä miten *HUS1*-geeni vaikuttaa rintasyöpäriskiin, ei tiedetä tämän tutkimuksen perusteella. *CSEIL*-geenillä ei huomattu olevan yhteyttä rintasyöpäriskiin. Rintasyöpäriskiä testattaessa sekä verrokkien että potilaiden määrät olivat riittävät tulosten luotettavuuden kannalta (verrokkien määrä vaihteli 311–382 välillä ja potilaiden määrä vaihteli 410–453 välillä). *HUS1*:n ja *CSEIL*:n eri polymorfismien yhteyttä klinisiin ennustetekijöihin arvioitaessa saatiin selville, että *HUS1*-geenin polymorfismeilla rs1056663, rs2242479 sekä rs3176564 on yhteys HER2:een (p-arvot järjestyksessä: p=0,005, p=0,002, p=0,001). Siten on mahdollista että *HUS1* vaikuttaisi HER2:n monistumiseen rintasyöpäkasvaimessa, mutta on myös mahdollista että HER2-positiivisia näytteitä oli testeissä liian vähän luotettavan tuloksen saamiseksi. *HUS1*:n eri polymorfismeilla saattaisi olla yhteys kasvaimen kokoon (rs3176582, p=0,049), mutta tulosten luotettavuuteen vaikuttaa harvinaisen

homotsygootin vähäinen määrä. *CSEIL*-geenin polymorfismeilla rs8118101 ($p=0,045$) ja rs8118101 ($p\text{-arvo}=0,049$) huomattiin olevan yhteys levinneisyysasteeseen. Myös levinneisyysaste määrityksissä harvinaista alleelia oli vähän, jolloin tulosten luotettavuus saattaa kärsiä. Mutta, jos halutaan vielä lisätä luotettavuutta, voidaan polymorfismeja tutkia suuremmalla näytemäärällä, jolloin saadaan lisää näytteitä myös harvinaista alleelia sisältäviin genotyyppeihin ja mahdollisesti saataisiin selville muitakin tässä tutkimuksessa löytymättä jääneitä polymorfismeja, jotka liittyvät rintasyöpäriskiin.

Espanjalaisessa tutkimuksessa saatiin *HUS1*:n suhteen samankaltaisia tuloksia kuin tässä työssä saatiin. Heidän työssään polymorfismilla rs2708861 oli yhteys rintasyöpäriskiin ($p\text{-arvo}=0,0008$) ja myös meidän tutkimuksessamme mukana ollut rs1056663 liittyi rintasyöpäriskiin ($p\text{-arvo}=0,0013$) (Vega ym., 2009). *HUS1* liittyy tutkimusten mukaan syöpään (Zimmerman ym., 2004, Huang ym., 2007), joten meidän tutkimuksen tulokset tukevat sitä että *HUS1*-geenillä saattaisi olla jonkinlainen rooli rintasyöpäriskin muodostumisessa.

Työn tekemisessä ja onnistumisessa on monia mahdollisia virhelähteitä, jotka pystyttiin ehkäisemään huolellisen työskentelyn avulla, kuten esimerkiksi näytteiden sekoittuminen kuoppalevyiltä otettaessa, virheellinen DNA:n sekä muiden reagenssien pipetointi, esimerkiksi DNA:n liian vähäinen määrä tai puuttuminen näytteseoksesta tai käytetyllä pipetinkärjellä pipetointi, jolloin näytteeseen pääsee toista DNA-näytettä. On myös mahdollista että näytteenkäsittelyvaiheessa näytteen sekaan voi päästä DNA:ta ympäristöstä, kuten esimerkiksi sylkeä, hiuksia tai ihosoluja. Tulosten analysointivaiheessa on mahdollista että alleelit merkitään väärin tai näyttenumerot sijoittuvat eri kohtaan kuin sitä vastaava genotyyppi. Mahdollisten virheiden poistamiseksi työssä näytteiden käsittely tehtiin tarkasti sekä kiinnitettiin huomiota tulosten oikein käsittelyyn. Mahdollisia virheitä pystyttiin sulkemaan pois myös kontrollien ja NTC-näytteiden avulla, jotka sulkivat pois reagenssien kontaminoitumisen vieraalla DNA:lla, sekä tekemällä muutamista näytteistä kaksi rinnakkaista toistoa.

Ihannelilanteessa välttääkseen tyyppin I virheitä (heikkoja tilastollisia merkkejä assosiaatiosta, jotka liittyvät tietyn kynnsarvon alittaviin p -arvoihin), joita usein tulee

populatioon perustuvissa tutkimuksissa (Ioannidis ym., 2004), ei pitäisi ajatella olevan todellisia biologisia assosiaatioita. Siksi lisätutkimukset, kuten replikaatiotutkimus itsenäisillä näytteillä sekä toiminnalliset assayt, olisivat tarpeellisia. Ottaen huomioon että suurimmasta osasta perheittäin esiintyvistä rintasyöpätautauksista puuttuu geneettiset markerit, olisi hyödyllistä tutkia mahdollista yhteyttä rintasyöpään lisää suuremmalla potilaiden määrällä tutkimuksessa (Esteban ym., 2012). Työssä tutkitut variantit sijaitsevat geenien alueella, jolloin on mahdollista että geenin ulkopuolella, esimerkiksi geenin säätelytekijöissä, olevat variantit vaikuttavat myös rintasyöpäriskiin. Joten parempien tulosten saamiseksi täytyisi tutkia myös geenin ulkopuolella sijaitsevia variantteja.

Yksittäisellä SNP:llä on rajoitettu kliininen hyöty, mutta polygeenisten riskiprofilien käyttö väestöön perustuvissa seulontatutkimuksissa tarjoaisi mahdollisesti uusia lähestymistapoja, erityisesti liitettynä muihin riskitekijöihin. Tällä hetkellä tunnetut matalan riskin geenivariantit rintasyövässä selittävät vain vähäisen osan perheittäin esiintyvistä rintasyövistä ja niiden riskejä ei vielä tiedetä tarkasti. Tämän vuoksi olisi tarpeen tutkia riskiä suurissa yhteistyöhankkeissa ja tarkentaa tuloksia, jotka liittyvät matalan riskin geenivariantteihin sekä tutkia uusia mahdollisia matalan riskin genejä sekä niiden ilmentymistä. (Cox ym., 2007).

LÄHDELUETTELO

Ahmed S, Thomas G, Ghoussaini M ym. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet* 2009;41:585-590

The American Joint Committee for Cancer (AJCC). Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, et al., editors. *AJCC cancer staging manual*. 5th edition. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1997

Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 2000;83:1031-1038

Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G ym. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer* 2002;86:76-83

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S ym. Average risks 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;72:1117-1130

Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM ym. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2008;82:937-948

Antoniou, AC, Wang X, Fredericksen ZS ym. A locus on 19p13 modifies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor-negative breast cancer in the general population. *Nat Genet* 2010;42:885-892

Athma P, Rappaport R, Swift M. Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;92:130-134

Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. www.atlasgeneticsoncology.org 7.4.2012

Ballabio A. The rise and fall of positional cloning? *Nat Genet* 1993; 3:277-279

Banin S, Moyal L, Shieh SY ym. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998;281:1674-1677

Bar-Shira A, Pinthus J, Rozovsky ym., Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res* 2002;62:6803-6807

Bartch H, Nair J, Owen RW ym. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999;20:2209-2218

Behrens P, Brinkmann U, Fogt F ym. Implications of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. *Anticancer Res* 2001;21:2413-2417

Behrens P, Brinkmann U, Wellmann A. CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis* 2003;8:39-44

Bermudez VP, Lindsey-Boltz LA, Cesare AJ ym. Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *PNAS USA* 2003;100:1633-1638

Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R ym. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1403-1408

- Blanco G. Halstedista nykypäivään – rintasyövän prognostisista tekijöistä prediktiviisiin tekijöihin. *Suom Lääkäril* 2001;56:1499–1505
- Bochar DA, Wang L, Beniya H ym. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 2000;102:257-265
- Bono P, Joensuu H. Rintasyövän uudet täsmälääkehoidot. *Duodecim* 2010;126:1205-1215
- Borresen AL, Andersen TI, Tretli S ym. Breast cancer and other cancers in Norwegian families with ataxia-telangiectasia. *Genes Chromosomes Cancer* 1990;2:339-340
- Borg A. Molecular and pathological characterization of inherited breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2001;11:375-385
- Botma M, Russel DI, Kell RA. Cowden's disease: a rare cause of oral papillomatosis. *J Laryngol Otol* 2002;116:221-223
- Botstein D, White R L, Skolnick M ym. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980;32:314–331
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genet* 2003;33:228–237
- Brinkmann U, Brinkmann E, Pastan I. Expression cloning of cDNAs that render cancer cells resistant to Pseudomonas and diphtheria toxin and immunotoxins. *Mol Med* 1995a;1:206–216
- Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M ym. Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995b;92:10427-10431
- Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M ym. Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. *Biochem* 1996;35:6891-6899
- Brinkmann U. CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:509-513
- Brinkmann U, Brinkmann E, Bera TK ym. Tissue-specific alternative splicing of the CSE1L/CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene. *Genomics* 1999;58:41-49
- Brustmann H. Expression of cellular apoptosis susceptibility in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2004;92:268-276
- Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2001;27:137-142
- Böni R, Wellmann A, Man YG ym. Expression of the proliferation and apoptosis-associated CAS protein in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 1999;21:125–128
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA ym. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998;281:1677-1679
- Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001;2:91-99
- Carter CL, Corle DK, Micozzi MS ym. A prospective study of the development of breast cancer in 16,692 women with benign breast disease. *Am J Epidemiol* 1988;128:467-477
- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. The Surveillance, Epidemiology, End Results (SEER) program of the National Cancer Institute. *Cancer* 1989;63:181–187

- Caspari T, Dahlen M, Kanter-Smoler G ym. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. *Mol Cell Biol* 2000;20:1254-1262
- Chapman MS, Verma IM. Transcriptional activation by BRCA1. *Nature* 1996;382:678-679
- CHEK2-Breast Cancer Consortium. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Nat Genet* 2002;31:55-59
- Chen J, Lindblom A. Germline mutation screening of the STK11/LKB1 gene in familial breast cancer with LOH on 19p. *Clin Genet* 2000;57:394-397
- Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y ym. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:469-477
- Claque J, Wilhoite G, Adamson A ym. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer from high-risk families. *PLoS One* 2011;6:e25632
- Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD ym. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996;77:2318-2324
- Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997;80:1588-1594
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Contraception* 1996;54:1-106
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *Lancet* 1997;350:1047-1059
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001;358:1389-1399
- Cortez D, Wang Y, Qin J ym. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999;286:1162-1166
- Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M ym. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 2007;39:352-358
- D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 2003;3:23-34
- Davis DL, Bradlow HL, Wolff M ym. Medical hypothesis: Xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 1993;101:372-377
- Dean FB, Lian, L, O'Donnell M. cDNA cloning and gene mapping of human homologs for *Schizosaccharomyces pombe* rad17, rad1, and hus1 and cloning of homologs from mouse, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *Genomics* 1998;54:424-436
- de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 2002;39:225-242
- de la Torre J, Gil-Moreno A, Garcia A ym. Expression of DNA damage checkpoint protein Hus1 epithelial ovarian tumors correlates with prognostic markers. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 27:24-32
- Dél ris P, Gayral S and Breton-Douillon M. Nuclear Ptdlns(3,4,5)P3 signaling: an ongoing story. *J Cel Biochem* 2006;98:469-485
- Donegan W. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *Cancer J Clin* 1997; 47: 28-51

- Donis-Keller H, Green P, Helms C, et al. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 1987;51:319–337
- Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312:146-151
- Easton DF. Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int Radiat Biol* 1994;66:177-182
- Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995;56:265-271
- Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Res* 1999;1:14-17
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007;447:1087-1093
- Eeles R, Cole T, Taylor R, et al. Prophylactic mastectomy for genetic predisposition to breast cancer: the proband's story. *Clin Oncol* 1996;8:222-225
- Eerola H, Aittomäki K, Nevanlinna H, et al. Perinnöllinen alttius rintasyöpään. *Suom Lääkäril* 2002;57:4695–4700
- Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664–1672
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403–410
- Eng C. PTEN: One gene, many syndromes. *Hum Mut* 2003;22:183-198
- Enoch T, Carr AM, Nurse P. Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev* 1992;6:2035–2046
- Esteban Cardeñosa E, de Juan Jiménez I, et al. Low penetrance alleles as risk modifiers in familial and sporadic breast cancer. *Fam Cancer* 2012 (Epub 29.8.12)
- Ewertz M, Dussy S, Adami H, et al. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *IJC* 1990;46:597-603
- Fletcher O, Houlston RS. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:353–361
- Fletcher O, Johnson N, Orr N, et al. Novel breast cancer susceptibility locus at 9q31.2: results of a genome-wide association study. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:425–435
- Folsom AR, Kaye SA, Prineas RJ, et al. Increased incidence of carcinoma of the breast associated with abdominal adiposity in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1990;131:794-803
- Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet* 1995;57:1457-1462
- Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998;62:676-689
- Fortunato L, Mascaro A, Poccia I, et al. Lobular Breast Cancer: Same Survival and Local Control Compared with Ductal Cancer, but Should Both Be Treated the Same Way? Analysis of an Institutional Database over a 10-Year Period. *Ann Surg Oncol*. 2011

- Freeman DJ, LiAG, Wei G ym. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* 2003;3: 117-130
- Fresno M, Molina R, Pérez del Rio M, ym. p53 expression is of independent predictive value in lymph node-negative breast carcinoma. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1268–1274
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington DC, 1995
- Fuks F, Milner J, Kouzarides T. BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* 1998;17:2531-2534
- Gallant P, Fry A, Nigg E. Protein kinases in the control of mitosis: focus on nucleocytoplasmic trafficking. *J cell sci suppl* 1995;19:21-28
- Garber JE, Goldstein AM, Kantor AF ym. Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* 1991;51:6094-6097
- Garcia MJ, Benitez J. The Fanconi anaemia/BRCA pathway and cancer susceptibility. Searching for new therapeutic targets. *Clin Transl Oncol* 2008;10:78–84
- Garfinkel L, Boffetta P, Stellman SD ym. Alcohol and breast cancer: a cohort study. *Prev Med* 1988;17:686-693
- Gasparini G, Pozza F, Hararis A. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1206–1219
- Gembka A, Toueille M, Smirnova E ym. The checkpoint clamp, Rad9-Rad1-Hus1 complex, preferentially stimulates the activity of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta in long patch base excision repair. *Nucleic Acids Res* 2007;35: 2596–2608
- Genecards, www.genecards.org, päivitetty 20.5.2012
- Ghoussaini M, Pharoah P. Polygenic susceptibility to breast cancer: current state-of-the-art. *Fut oncol* 2009;5:689-701
- Ghoussaini M, Fletcher O, Michailidou K ym. Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci. *Nar Genet* 2012;44:312-318
- Giardiello FM, Welsh BW, Hamilton SR. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987;316:1511-1514
- Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC ym. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000;119:1447-1453
- Gissel T, Rejnmark L, Mosekilde L ym. Intake of vitamin D and risk of breast cancer--a meta-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;111:195-199
- Gram IT, Braaten T, Terry PD ym. Breast cancer risk among women who start smoking as teenagers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:61-66
- Guan X, Madabushi A, Chang DY ym. The human checkpoint sensor Rad9-Rad1-Hus1 interacts with and stimulates DNA repair enzyme TDG glycosylase. *Nucleic Acids Res* 2007;35: 6207–6218
- Haiman CA, Chen GK, Vachon CM ym. A common variant at the TERT-CLPTM1L locus is associated with estrogen receptor-negative breast cancer. *Nat Genet* 2011;43:1210–1214
- Hall JM, Lee MK, Newman B. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990;250:1684-1689
- HapMap <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> elokuu 2010

- Harrison JC, Haber JE. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 2006;40:209–235
- Hartikainen JM, Tuhkanen H, Kataja V ym. An Autosome-wide scan for linkage disequilibrium-based association in sporadic breast cancer cases in Eastern Finland: three candidate regions found. *CEBP* 2005;14:75-80
- Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE ym. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med* 1999;340:77-84
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246: 629–634
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821–1828
- He W, Zhao Y, Zhang C ym. Rad9 plays an important role in DNA mismatch repair through physical interaction with MLH1. *Nucleic Acids Res* 2008;36: 6406–6417
- Hearle N, Schumacher V, Menko FH ym. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res* 2006;12:3209-3215
- Hedley D, Clark G, Cornelisse C, ym. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry* 1993; 14: 482–485
- Helt CE, Wang W, Keng PC ym. Evidence that DNA damage detection machinery participates in DNA repair. *Cell Cycle* 2005;4:529–532
- Hemminki A, Markie D, Tomlinson I ym. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998;391:184-187
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411: 366–374
- Hopkins KM, Wang X, Berlin A, Hang H, Thaker HM, Lieberman HB. Expression of mammalian paralogues of HRAD9 and Mrad9 checkpoint control genes in normal and cancerous testicular tissue. *Cancer Res* 2003;63:5291-5298
- Holt JT, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C ym. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet* 1996;12:298-302
- Howe GR, McLaughlin J. Breast cancer mortality between 1950 and 1987 after exposure to fractionated moderate-dose-rate ionizing radiation in the Canadian fluoroscopy cohort study and a comparison with breast cancer mortality in the atomic bomb survivors study. *Radiat Res* 1996;145:694-707
- Huang J, Yuan H, Lu C ym. Jab1 mediates protein degradation of the Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex. *J Mol Biol* 2007;371:514–527
- Hui AB, Lo KW, Yin XL ym. Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridizations. *Lab Invest* 2001;81:717-723
- Hui AB, Lo KW, Teo PM ym. Genome wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array based comparative genomic hybridization. *Int J Oncol* 2002;20:467-473
- Hunter D, Willet W. Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:110-132
- Hunter DJ, Kraft P, Jakobs KB ym. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 2007;39:870-874
- Huovinen P, Mustajoki P, Rintasyöpa, *Lääkärikirja Duodecim* 2007

- Hähnel R. Progesterone receptor assay in the management of breast and other cancers. *Rev Endocr Rel Cancer* 1985;20:5–11
- Hästbacka J, Kaitila I, Sistonen P ym. Diastrophic dysplasia gene maps to the distal long arm of chromosome 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8056–8059
- Hästbacka J, de la Chapelle A, Kaitila I, ym. Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finland. *Nature Genetics* 1992;2:204–211
- Hästbacka J, Salonen R, Laurila P, ym. Prenatal diagnosis of diastrophic dysplasia with polymorphic DNA markers. *J Med Genet* 1993;30:265–268
- Idbaih A, Carvalho Silveira R, Crinière E ym. Genomic changes in progression of low-grade gliomas. *J Neurooncol* 2008;90:133-140
- International Union Against Cancer (UICC), 1950
- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA. 'Racial' differences in genetic effects for complex diseases. *Nat Genet* 2004;36:1312–1318
- Isaacs C, Stearns V, Hayes DF. New prognostic factors for breast cancer recurrence. *Semin Oncol* 2001;28:53–67
- Jacquemont C, Taniguchi T. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem* 2007;8 (Suppl 1):10
- Janerich DT, Hoff MB. Evidence for a crossover in breast cancer risk factors. *Am J Epidemiol* 1982;116:737-742
- Jenne DE, Reimann H, Nezu J ym. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998;18:38-43
- Jernström H, Lerman C, Ghadirian P ym. Pregnancy and risk of early breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2. *Lancet* 1999;354:1846-1850
- Joensuu H, Roberts PJ, Lyly T, Tenhunen M. Syöpätaudit. 3. painos. 2007 Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, s. 122-129
- Johnson KC. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2005;117:619-628
- Jorgenson E, Witte JS. Genome-wide association studies of cancer. *Future Oncol* 2007;3:419-427
- Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:179-186
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:36-47
- Kere J, Sistonen P, Holmberg C ym. The gene for congenital chloride diarrhea maps close to but is distinct from the cystic fibrosis transmembrane regulator gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10686–10688
- Kim I, Kim D, Han S ym. Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cells inhibits nuclear import of p53. *J Biol Chem* 2000;275:23139-23145
- Kim SH, Cha ES, Park CS ym., Imaging features of invasive lobular carcinoma: comparison with invasive ductal carcinoma. *Jpn J Radiol* 2011;29:475-482

- Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761-763
- Klijn JG, Janin N, Cortes-Funes H ym. Should prophylactic surgery be used in women with a high risk of breast cancer? *Eur J Cancer* 1997;33:2149-2159
- Kutay U, Bischoff FR, Kostka R ym.. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 1997;90:1061-1071
- Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A ym. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med* 1994;331:5-9
- Layde PM, Webster LA, Baughman AL ym. The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *J Clin Epidemiol* 1989;42:963-973
- Lehesjoki A-E, Koskiniemi M, Sistonen P ym. Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3696-3699
- Lehesjoki A-E, Koskiniemi M, Pandolfo M ym. Linkage studies in progressive myoclonus epilepsy: Unverricht-Lundborg and Lafora-s diseases. *Neurolog* 1992;42:1545-1550
- Lehesjoki A-E, Eldridge R, Eldridge J ym. Progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type: clinical and molecular study of a family from the United States. *Neurolog* 1993(a);43:2384-2386
- Lehesjoki A-E, Koskiniemi M, Norio R ym. Localization of the EPM1 gene for progressive myoclonus epilepsy on chromosome 21: linkage disequilibrium allows high resolution mapping. *Hum Molec Genet* 1993(b);2:1229-1234
- Lehesjoki A E, Tassinari C A, Avanzini G ym. PME of Unverricht| Lundborg type in the Mediterranean region: linkage and linkage disequilibrium confirm the assignment to the EPM1 locus. *Hum Genet* 1994;9:668-674
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B ym. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-649
- Levrán O, Attwooll C, Henry RT ym. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anaemia. *Nat Genet* 2005;37:931-933
- Li AG, Piluso LG, Cai X ym. Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. *Mol Cell* 2006;23: 575-587
- Li FP, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1969;43:1365-1373
- Li F, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ ym. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988;48:5358-5362
- Lian Z and Di Cristofano A. Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene* 2005;24: 7394-7400
- Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *PNAS USA* 1998;95:5172-5177
- Liao CF, Luo SF, Li LT ym. CSE1L/CAS, the cellular apoptosis susceptibility protein, enhances invasion and metastasis but not proliferation of cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:15
- Liaw D, Marsh DJ, Li J ym. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997;16:64-67

- Liberman L, Schneider L. Review of published experience. Sentinel Lymph Node Biopsy. Cody HS, ed. Martin Duniz Ltd., London 2001. s. 285-310
- Lichtenstein P, Holm N, Verkasalo P ym. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. *N Engl J Med* 2000;343:78–85
- Longhese MP, Foiani M, Muzi-Falconi M, Lucchini G, Plevani P. DNA damage checkpoint in budding yeast. *EMBO J* 1998;17;5525–5528
- Longy M, Lacombe D. Cowden disease. Report of a family and review. *Ann Genet* 1996;39:35-42
- Lorenzato A, Cosimo M, Nadia D ym. The cellular apoptosis susceptibility *CAS/CSEIL* gene protects ovarian cancer cells from death by suppressing RASSF1C. *FASEB J* 2012;26:2446-2456
- Lukas J, Lukas C, Bartek, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 2004;3:997–1007
- MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J ym. Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1982;30:427-431
- Malafosse A, Lehesjoki A E, Genton P ym. Identical genetic locus for Baltic and Mediterranean myoclonus. *Lancet* 1992;339:1080–1081
- Malkin D, Li FP, Strong LC ym. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-1238
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998;282:1893-1897
- Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem* 2002;27:462-467
- McTiernan A, Kooperberg C, White E ym. Recreational Physical Activity and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, USA. *JAMA* 2003;290:1331-1333
- Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H ym. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 2003;72:1308-1314
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C ym.. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2010;42:410–414
- Melo J, Toczyski D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:237–245
- Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C ym. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *Int J Mol Med* 2008;22:433-439
- Middeler G, Zerf K, Jenovai S ym. The tumor suppressor p53 is subject to the both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* 1997;14:1407-1417
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D ym. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266:66-71
- Milne RL, Benítez J, Heikkinen T ym. Risk of estrogen –positive and –negative breast cancer and single-nucleotide polymorphism 2q35-rs13387042. *JNCI* 2009;101:1012-1018
- Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L ym. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 1997;386:772-773

Moroianu J, Blobel G, Radu A. Nuclear protein import: Ran-GTP dissociates the karyopherin alphabeta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7059-7062

Morton N E. The detection and estimation of linkage between the genes for elliptocytosis and the Rh blood type. *Am J Hum Genet* 1956;8:80-96

Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 1999;4:511-518

Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001;7:263-272

Murtaugh MA, Sweeney C, Giuliano AR ym. Diet patterns and breast cancer risk in Hispanic and non-Hispanic white women: the Four-Corners Breast Cancer Study. *Am J Clin Nutr* 2008;87:978-984

Männistö S. Diet, body size and risk of breast cancer. A case-control study. *Publications of the National Public Health Institute A 17/1999*. Helsinki National Public Health Institute, 1999

Nagata C. Factors to consider in the association between soy isoflavone intake and breast cancer risk. *J Epidemiol* 2010;20:83-89

Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H. Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat Res* 1999;424:59-69

Nakamura Y, Leppert M, O-Connell P ym. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987;235:1616-1621

National Cancer Institute www.cancer.gov, 1.9.2011

NCBI SNP database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, 10.10.2012

Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA ym. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* 1996;13:114-116

Neta G, Brenner AV, Sturgis EM ym., Common genetic variants related to genomic integrity and risk of papillary thyroid cancer. *Carcinogenesis* 2011;32:1231-1237

Newman B, Millikan RC, King MC. Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. *Epidemiol Rev* 1997;19:69-79

Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW ym. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 2002;36:617-656

Ogryzko T, Knutzen R, Steinbeck R ym. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gain and losses during the genesis of colorectal tumors. *Gene Chrom Cancer* 1996;15:234-245

O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM ym. The G2-phase DNA damage checkpoint. *Trends Cell Biol* 2000;10:296-303

Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J ym. The CHEK2*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families. *Cancer Res* 2003;63:8153-8157

Olsen JH, Hahnemann JM, Borresen-Dale AL ym. Cancer in patients with ataxia-telangiectasia and in their relatives in Nordic Countries. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:121-127

- Page DL, Kidd TE Jr, Dupont WD ym. Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Hum Pathol* 1991;22:1232–1239
- Palmer LJ, Cardon LR. Shaking the tree: Mapping complex disease genes using linkage disequilibrium. *Lancet* 2005;336:1223–1234
- Parilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L. Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA repair* 2004 3:1009-1014
- Paulovich AG, Armour CD, Hartwell LH. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* 1998;150:75–93
- Peiro G, Diebold J, Lohrs U. CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene expression in ovarian carcinoma: Correlation with 20q13.2 copy number and cyclin D1, p53, and Rb protein expression. *Am J Clin Pathol* 2002;118:922-929
- Peto J, Collins N, Barfoot R ym. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:943-949
- Pharoah PD, Day NE, Duffy S ym. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 1997;71: 800-809
- Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M ym. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 2002;31:33–36
- Pharoah P, Alison M ym. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* 2004;4:850-859
- Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF ym. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med* 2008;358:2796-2803
- Pippard EC, Hall AJ, Barker DJP, Bridges BA. Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia-telangiectasia and xeroderma pigmentosum in Britain. *Cancer Res* 1988;48:2929-2932
- Prakash S, Sung P, Prakash L ym. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 1993;27:33–70
- Preston DL, Mattsson A, Holmberg E ym. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res* 2002;158:220-235
- Rahman N, Seal S, Thompson D ym. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2007;39:165-167
- Reid S, Schindler D, Henenberg H ym. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 2007;39:162-164
- Reis-Filho JS, Lakhani SR. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res.* 2003;5:313–319
- Remvikos Y, Mosseri V, Asselain B, ym. S-phase fractions of breast cancer predict overall and post-relapse survival. *Eur J Cancer* 1997; 33: 581–586
- Renwick J H, Lawler S D. Linkage between the AB0 and nail-patella loci. *Ann Hum Genet* 1955;19:312–331
- Renwick A, Thompson D, Seal S ym. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006;38:873-875

- Ries LA, Henson, DE, Harras A. Survival from breast cancer according to tumor size and nodal status. *Surg Oncol Clin North Am* 1994;3:35–52
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847-856
- Rosen PP, Groshen S, Saigl PE ym. A long-term follow-up study of survival in Stage I (T1N0M0) and Stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989;7:355–366
- Rosen P, Lesser M, Arroyo C, ym. p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 1995; 13: 821–830
- Russo IH, Russo J. Hormonal approach to breast cancer prevention. *J Cell Biochem Suppl* 2000;34:1-6
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73: 39–85
- Scherf U, Pastan I, Willingham MC ym. The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:2670-2674
- Schlessinger D, Kere J. YAC-based mapping of genome structure, function, and evolution. *Genome analysis. Strategies for physical mapping. 4. painos, 1992, s. 131–159.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scholl S, Biéche I, Pallaud C, ym. Relevance of multiple biological parameters in breast cancer prognosis. *Breast* 1996; 5: 21–30
- Schrenk P, Hatzl-Griesenhofer M, Shamiyeh A ym. Follow-up of sentinel node negative breast cancer patients without axillary lymph node dissection. *J Surg Oncol* 2001;77:165–170
- Schutte M, da Costa LT, Hahn SA ym. Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the BRCA2 region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:5950-5954
- Scully R, Anderson SF, Chao DM ym. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5605-5610
- Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000;408:429-432
- Seal A, Thompson D, Renwick A ym. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006;38:1239-41
- Seely D, Mills EJ, Wu P ym. The effects of green tea consumption on incidence of breast cancer and recurrence of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Integr Cancer Ther* 2005;4:144-155
- Shiomi Y, ShiShinozaki A, Nakada D ym. Clamp and clamp loader structures of the human chekpoint proteins complexes, Rad9-1-1 and Rad17-RFC. *Genes Cells* 2002;7:861-868
- Simonsen N, van't Veer P, Strain JJ ym. Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. *Am J Epidemiol* 1998;147:342-352
- Singh VM, Nurmohamed S, Davey SK, Jia Z. Tri-cistronic cloning, overexpression and purification of human Rad9, Rad1, Hus1 protein complex. *Protein Expr Purif* 2007;54:204-211
- Singletary SE, Allred C, Ashley P ym. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3628-3636

- Smeenk G, de Groot AJ, Romeijn RJ ym. Rad51C is essential for embryonic development and haploinsufficiency causes increased DNA damage sensitivity and genomic instability. *Mutat Res* 2010;689:50–58
- Smith AV, Thomas DJ, Munro HM, Abecasis GR. Sequence features in regions of weak and strong linkage disequilibrium. *Genome Res* 2005;15:1519–1534
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS ym. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998;279:535-540
- Stambolic V, MacPherson D, Sas D ym. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001;8: 317-325
- Stacey SN, Manolescu A, Sulem P ym. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 2007;39:865–869
- Stacey SN, Manolescu A, Sulem P ym. Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor–positive breast cancer. *Nat Genet* 2008;40:703–706
- Starink TM, van der Veen JP, Arwert F ym. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet* 1986;29:222-233
- Su TT. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet* 2006;40:187–208
- Sulisalo T, Sistonen P, Hästbacka J ym. Cartilage-hair hypoplasia gene assigned to chromosome 9 by linkage analysis. *Nature Genetics* 1993;3:338–341
- Suomen syöpärekisteri, www.syoparekisteri.fi, päivitetty 21.10.2011
- Suzuki R, Orsini N, Saji S ym. Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status -a meta-analysis. *Int J Cancer* 2009;124:698-712
- Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase L. Breast and other cancers infamilies with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1987;316:1289-1294
- Swift M, Morrel D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1991;325:1831-1836
- Syöpäjärjestöt www.cancer.fi, 21.11.2011
- Szabo CL, King M. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997;60:1013–1020
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidategene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Rev Genet* 2002;3:391–397
- Tai C, Hsu C, Shen S ym., Cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein in cancer metastasis and chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:110
- Tai CJ, Shen SC, Lee WR. Increased cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein expression promotes protrusion extension and enhances migration of MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2010;316:2969-2981
- Thacker J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* 2005;219:125–135
- Thiébaud AC, Chajès V, Gerber M ym. Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* 2009;124:924-931

- Thomas G, Jacobs KB, Kraft P *et al*. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nat Genet* 2009;41:579–584
- Thomas R, Edward M, Marks R. Translocation of the retinoblastoma gene product during mitosis. *Exp cell res* 1996;223:227-232
- Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS *et al*. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* 1995;9:444-450
- Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9:221-236
- Thompson D, Duedal S, Kirner J *et al*. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM carriers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:813-822
- Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA *et al*. Distinct somatic genetic changes with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res* 1997;57:1222-1227
- Toikkanen S, Joensuu H. Prognostic factors and long-term survival in breast cancer in a defined urban population. *APMIS* 1990; 98: 1005–1014
- Tomlinson IP, Houlston RS. Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 1997;34:1007-1011
- Tong CY, Hui AB, Yin XL *et al*. Detection of oncogene amplifications in medulloblastomas by comparative genomic hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *J Neurosurg* 2004;100:187-193
- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1972;48:605-613
- Trichopoulou A, Bamia C, Lagiou P *et al*. Conformity to traditional Mediterranean diet and breast cancer risk in the Greek EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) cohort. *Am J Clin Nutr* 2010;92:620-625
- Turnbull C, Ahmed S, Morrison J *et al*. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:504–507
- Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 2002;71:432-438
- van Diest PJ. Ductal carcinoma in situ in breast carcinogenesis. *J Pathol* 1999;187:383–384
- Varghese JS, Easton DF. Genome-wide association studies in common cancers —what have we learnt? *Curr Opin Genet Dev* 2010;20:201–209
- Vaz F, Hanenberg H, Schuster B *et al*. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet* 2010;42:406–409
- Vega A, Salas A, Milne RL *et al*. Evaluating new candidate SNPs as low penetrance risk factors in sporadic breast cancer: a two-stage Spanish case-control study. *Gynecol Oncol* 2009;112:210-214
- Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002;108:171-182
- Vogelstein B. A deadly inheritance. *Nature* 1990;348:681-682
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-310
- Volkmer E, Karnitz LM. Human homologs of *Schizosaccharomyces pombe* rad1, hus1, and rad9 form a DNA damage-responsive protein complex. *J Biol Chem* 1999;274:567-570

- Vuorela M, Pylkäs K, Hartikainen JM ym. Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:1003-1010
- Wang H, Shao N, Ding Q ym. BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene* 1997;15:143-157
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P ym. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000;14:927-939
- Wang SC, Shao R, Pao AY ym. Inhibition of cancer cell growth by BRCA2. *Cancer Res* 2002;62:1311-1314
- Wang J, Cinstantino JP, Tan-Chiu E ym. Lower-category benign breast disease and the risk of invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:616-620
- Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C ym. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analysis of 26,000 patients cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 2008; 26: 542-548
- Weiss RS, Matsuoka S, Elledge SJ ym. Hus1 acts upstream of chk1 in mammalian DNA damage response pathway. *Curr Biol* 2002;12:73-77
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C ym. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992;359:794-801
- Welsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 2000;16:69-74
- Welsch PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:705-713
- Wellmann A, Krenacs L, Fest T ym. Localization of the cell proliferation and apoptosis-associated CAS protein in lymphoid neoplasms. *Am J Pathol* 1997;150:25-30
- Wellmann A, Flemming P, Behrens P ym. High expression of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene in hepatitis and liver neoplasms: correlation with tumor progression. *Int J Mol Med* 2001;7:489-494
- Witzig T, Ingle J, Schaid D, ym. DNA ploidity and percent s-phase as prognostic factors in node-positive breast cancer: results from patients enrolled in two prospective randomized trials. *J Clin Oncol* 1993;11: 351-359
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J ym. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265:2088-2090
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J ym. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995;378:789-792
- World Health Organization. *Histological Typing of Breast tumours*. In: *International histologic classification of tumours*. ed. 2. Geneva, WHO 1981
- Xia B, Sheng Q, Nakanishi K ym. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 2006;22:719-729
- Xiao Z, McGrew JT, Schroeder AJ ym. CSE1 and CSE2, two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993;13:4691-4702
- Xu X, Weaver Z, Linke SP ym. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient. *Moll Cell* 1999;3:389-395

Yang S, Kuo C, Bisi JE, Kim MK. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* 2002;4:865-870

Yarden RI, Brody LC. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4983-4988

Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J ym. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol* 2011;12:477-488

Zheng W, Gustafson DR, Sinha R ym. Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1724-1729

Zheng W, Long J, Gao YT ym. Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1 *Nat Genet* 2009;41:324-328

Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-439

Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC ym. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1819-1827

Zimmerman ES, Chen J, Andersen JL ym. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. *Mol Cell Biol* 2004;24:9286-9294

Zou L, Cortez D, Elledge SJ. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* 2002;16:198-208