

ANÀLISIMOLECULAR DELSGENSBRCA1I BRCA2ENELCÀNCER DEMAMAHEREDITARI



CARACTERITZACIÓDE
MUTACIONSRECURRENTSI
ESTUDIDEVARIANTSDEEFECTE
BIOLÒGICDESCONEGUT



Sant Pau



UNIVERSITAT DE BARCELONA
U
B

Memòria presentada per
Berta Campos i Estela

per optar al grau de
Doctora en Bioquímica

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Orland Díez i Gibert
al Servei de Genètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica
de la Facultat de Medicina.

Programa de Biologia i Patologia Cel·lular, bienni 2000-2002.

Tutor: Dr. Carles Enrich i Bastús.

El director,

L'autora,

Orland Díez i Gibert

Berta Campos i Estela

Barcelona, 2006

La realització de la present Tesi Doctoral ha generat les següents publicacions en revistes de l'especialitat:

- 1** DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER HEREDITARIO.
O Díez, **B Campos**, M Baiget.
Medicina Clínica 2000; 15: 190-197.
- 2** BASES MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO.
M Baiget, O Díez, **B Campos**, MC Alonso.
Revista de Senología y Patología Mamaria 2001; 14: 20-24.
- 3** *BRCA2* MUTATION ANALYSIS OF 87 SPANISH BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES.
B Campos, O Díez, M Domènech, M Baena, C Pericay, E del Río, J Balmaña, C Alonso, M Baiget.
Annals of Oncology 2001; 12:1699-1703.
- 4** CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS Y EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* O *BRCA2*.
C Pericay, O Díez, **B Campos**, J Balmaña, M Domènech, M Baena, JM Sabaté, A Gómez, JJ López, M Baiget, C Alonso.
Medicina Clínica 2001; 117:161-166.
- 5** CONDITIONS FOR SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) ANALYSIS IN *BRCA1* GENE IN AN AUTOMATED SYSTEM.
B Campos, O Díez, J Cortés, M Domènech, C Alonso, M Baiget.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2001; 39: 401-404.
- 6** THE R71G *BRCA1* IS A FOUNDER SPANISH MUTATION AND LEADS TO ABERRANT SPLICING OF THE TRANSCRIPT.
A Vega*, **B Campos***, B Bressac de Paillerets, PM Bond, N Janin, FS Douglas, M Domènech, M Baena, C Pericay, C Alonso, A Carracedo, M Baiget, O Díez.
*Aquests autors han contribuït en la mateixa mesura al treball.
Human Mutation 2001; 17:520-521.

- 7** ANALYSIS OF *BRCA1* AND *BRCA2* GENES IN SPANISH BREAST/OVARIAN CANCER PATIENTS: A HIGH PROPORTION OF MUTATIONS UNIQUE TO SPAIN AND EVIDENCE OF FOUNDER EFFECT.

O Díez, A Osorio, M Durán, JI Martínez-Ferrandis, M de la Hoya, R Salazar, A Vega, **B Campos**, R Rodríguez-López, E Velasco, J Chaves, E Díaz-Rubio, JJ Cruz, M Torres, E Esteban, A Cervantes, C Alonso, JM San Román, R González-Sarmiento, C Miner, A Carracedo, ME Armengod, T Caldés, J Benítez, M Baiget.

Human Mutation 2003; 22:301-312.
- 8** HAPLOTYPE ANALYSIS OF THE *BRCA2* 9254delATCAT RECURRENT MUTATION IN BREAST/ OVARIAN CANCER FAMILIES ORIGINATED FROM SPAIN.

B Campos, O Díez, F Odefrey, M Domènech, V Moncoutier, JI Martínez-Ferrandis, A Osorio, J Balmaña, A Barroso, ME Armengod, J Benítez, C Alonso, D Stoppa-Lyonnet, D Goldgar, M Baiget.

Human Mutation 2003; 21:452.
- 9** RNA ANALYSIS OF EIGHT *BRCA1* AND *BRCA2* UNCLASSIFIED VARIANTS IDENTIFIED IN BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES FROM SPAIN.

B Campos, O Díez, M Domènech, M Baena, J Balmaña, J Sanz, A Ramírez, C Alonso, M Baiget.

Human Mutation 2003; 22:337.
- 10** ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO EN PORTADORES DE LA MUTACIÓN 6857delAA EN EL GEN *BRCA2* EN 4 FAMILIAS CON CÁNCER DE MAMA/OVARIO HEREDITARIO.

B Campos, O Díez, C Álvarez, L Palma, M Domènech, J Balmaña, J Sanz, A Ramírez, C Alonso, P Carvalho, M Baiget.

Medicina Clínica 2004; 123:543-545.
- 11** SEX RATIO DISTORTION IN OFFSPRING OF FAMILIES WITH *BRCA1* OR *BRCA2* MUTANT ALLELES: AN ASCERTAINMENT BIAS PHENOMENON?

J Balmaña, O Díez, **B Campos**, M Majewski, J Sanz, C Alonso, M Baiget, JE Garber.

Breast Cancer Research and Treatment 2005; 92:273-277.

Als meus pares

Als meus amics

AGRAÏMENTS

Ha arribat l'hora de donar-vos les **GRÀCIES A TOTS**.

Gràcies a l'Orland per haver-me guiat en aquesta odissea que semblava que no s'acabaria mai, i ja hi som! Gràcies per la paciència que has tingut i per aguantar la compostura en tot moment.

Gràcies a la Montse Baiget per haver-me donat l'oportunitat de ser aquí.

Gràcies als companys i companyes de l'equip de Càncer de Mama. Gràcies al Joan, qui em va ajudar a fer els primers passos. Gràcies a la Montse Do i al Manel, gràcies pel vostre companyerisme i per ser al meu costat fins al final. I gràcies a la Mònica Cornet i a la Sara G pels consells d'última hora.

Gràcies a tot l'equip del Servei d'Oncologia de l'Hospital de Sant Pau. Gràcies Carmen per la teva humanitat. Gràcies per fer-me recordar que la nostra feina porta noms i cognoms. Gràcies a la col·laboració de totes les famílies que han format part d'aquest estudi. Gràcies al Carles Pericay, la Judith Balmaña i, molt especialment, gràcies Judit per ser com ets, per les hores de feina compartides i els dinarets entretinguts, espero que algun dia ens tornem a trobar...

Gràcies a tots els qui durant aquests anys heu estat al Servei de Genètica. Gràcies per ajudar-me quan he necessitat un cop de mà, o simplement una mica d'ànimus... Gràcies a la Carol, la Ivon i la Sara per haver compartit tants moments dins i fora l'hospital. Gràcies per la vostra amistat. Gràcies a les veteranes, Mònica Calaf, Eli, Marijesus i Marijose, per ser un punt de referència en aquestes anades i vingudes. Gràcies a tota la resta, als qui en cara hi sou, i als qui hi heu estat: Pia, Eduardo, Laura Alías, Laura de Jorge, Dori, Alba, Lidia, Eva, Vanesa, Lidia, Laia, Adriana, Carles, Loreto, Anna, Eva i Montsita. Gràcies a la Maria Antònia, l'Anna, la Montse, la Josefa, la Marta i la Neus.

Gràcies al Lluís, l'Elena, l'Ester i la Helen del Servei d'Anatomia Patològica. Gràcies als nostres veïns de Coagulació. Gràcies a la Maria, per no haver-me deixat sola en la recta final.

Gràcies a l'Eduard i les nenes del Banc de Sang. Gràcies Marina per haver-me fet disfrutar treballant, gràcies per haver estat tant bona companya.

Gràcies al Carles Enrich per haver acceptat ser el tutor d'aquesta tesi, i gràcies a la Núria per la immensa paciència que has tingut amb mi (encara no s'ha acabat!). Gràcies per la teva alegria que tant bé m'ha anat en segons quins moments crítics...

Gràcies a tots els meus amics. Gràcies per la paciència que heu tingut, no sé què hauria fet sense vosaltres... !!!!! Gràcies a les nenes de Rocafort, gràcies Laura, Maria i Alcía per haver-me aguantat tants alts i baixos, vosaltres sou qui més heu patit aquest dia a dia... Gràcies per haver-me cuidat tant, un dia d'aquests us preparo una paella... Gràcies Sandra Petita pel caliu que sempre m'has donat. Gràcies a les nenes de Súnion per ser amb mi després de tants anys... Gràcies Noe

per tot, per les escapades de cap de setmana i els vespres al sofà, per l'ajuda professional i pels consells artístics... Gràcies Sandra per ser tant a prop. Gràcies Eva, Eli, Mireia Martín, Mireia Ruiz i Tània, gràcies pel suport que m'heu donat i per les mil aventures que hem passat juntes. Gràcies a la colla Ravalera, gràcies David i Fer per ajudar-me en tot el que m'ha calgut, gràcies Fer pel disseny de la portada, m'encanta. Gràcies Albert per ser així i fer-me riure encara que no en tingui ganes... Gràcies Héctor pel teu carinyu, tinc ganes de tornar a viatjar amb tu a les amèriques. Gràcies Romina, Eva, Víctor, Anna, Mireia, Carlota i Oriol. Gràcies Carmensita pels vermutillos i les festes loques. Gràcies Txell per ser amb mi des de sempre, pels estius a Can Roca, pels mesos a Gràcia, per tot. Gràcies Martes per compartir també aquelles èpoques. Gràcies a les nenes del cole, gràcies Rita, Carolina, Gaëlle, Gemma i Anna. Gràcies Sandra per continuar essent l'amiga dels divendres a la tarda. Gràcies Jordi. Gràcies Marc per les bones estones acompanyades dels millors vins i caves. Gràcies als companys de la facu, gràcies Mireia, Ariadna, Laia, Isa i Sònia. Gràcies Pol, Mercè, Gemma, Susana, Dani, Sandra i Cristina. Gràcies als nens i nenes de Lleida per aparèixer quan necessitava companyia, gràcies David, Nuri, Anna, Manel i Rober. Gràcies Miquel per alegrar-me els dijous al migdia. Gràcies Glòria pels cafès a corre-cuita i les llargues estones de xerrera. Gràcies Fina pel teu bon humor, m'encanta tenir una nova tieta a Cadaqués. Gràcies Glòria per l'assessorament lingüístic i les passejades pel bosquet.

I gràcies a tots els qui en algun moment o altre us heu creuat en la meua vida. Ja em perdonareu si m'he deixat algú...

I per acabar, gràcies a tota la meua família. Gràcies cosins i cosines, tiets i tietes, gats i gossos... Gràcies Consol. Gràcies avi, gràcies àvia. Gràcies al meu germà Oriol i, molt especialment, gràcies als meus pares. Gràcies per donar-me suport en tot el què he fet. Gràcies per escoltar-me quan he necessitat desfogar-me, per riure o plorar quan ha calgut, per animar-me quan ho veia tot de color negre... Gràcies per ser com sou.

GRÀCIES.

PRESENTACIÓ

El càncer de mama és la neoplàsia més freqüent en la dona a Catalunya, amb una prevalença de 45.000 casos, el que representa el 28% dels tumors. L'any 2005 es van diagnosticar prop de 4.000 nous casos i la seva incidència augmenta aproximadament un 2% cada any.

Entre un 5% i un 10% de tots els casos presenta un component hereditari degut a mutacions germinals en gens de susceptibilitat, fonamentalment *BRCA1* i *BRCA2*, els quals s'associen a la síndrome de càncer de mama i ovari hereditari. Globalment, les alteracions en aquests gens afecten un gran nombre de dones i famílies en la nostra població.

L'estudi dels gens *BRCA* té un gran interès per valorar amb més certesa el risc dels individus portadors, els quals poden beneficiar-se de mesures preventives, de detecció precoç o terapèutiques adequades.

Addicionalment, l'anàlisi de les variants genètiques de *BRCA1* i *BRCA2* identificades pot contribuir a la comprensió dels mecanismes de transformació cel·lular maligna en els que intervenen aquests gens.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1 BASES GENÈTIQUES DEL CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI	3
1.1 ANTECEDENTS HISTÒRICS DEL CÀNCER DE MAMA FAMILIAR.....	3
1.2 IDENTIFICACIÓ DELS PRINCIPALS GENS DE SUSCEPTIBILITAT MAJOR AL CÀNCER DE MAMA: <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	3
1.3 ESTRUCTURA DELS GENS <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	4
1.4 CARACTERÍSTIQUES DE LES PROTEÏNES <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	5
1.4.1 <i>BRCA1</i> : estructura, localització cel·lular i interacció amb altres proteïnes.....	5
1.4.2 <i>BRCA2</i> : estructura, localització cel·lular i interacció amb altres proteïnes.....	9
1.4.3 Expressió de <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	10
1.5 FUNCIONS DE LES PROTEÏNES <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	12
1.5.1 Reparació del DNA.....	13
1.5.2 Regulació de la transcripció.....	14
1.5.3 Remodelació de la cromatina.....	15
1.5.4 Ubiquïtinització.....	16
1.5.5 Control del cicle cel·lular.....	16
1.5.6 Les funcions <i>BRCA</i> i la susceptibilitat al càncer.....	17
1.5.7 Paper dels estrògens en la funció <i>BRCA</i> i la progressió tumoral.....	18
2 MUTACIONS GERMINALS EN ELS GENS <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i> EN EL CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI	19
2.1 TIPUS DE MUTACIONS.....	20
2.2 MÈTODES DE DETECCIÓ DE MUTACIONS.....	20
2.3 FREQUÈNCIA DE MUTACIONS.....	21
2.4 MUTACIONS RECURRENTS.....	24
2.5 PENETRÀNCIA I EXPRESSIVITAT.....	25
2.5.1 Risc de càncer de mama i ovari.....	26
2.5.2 Risc de càncer de mama en homes.....	26
2.5.3 Risc d'altres càncers associats a <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	27
2.5.4 <i>BRCA2</i> i l'Anèmia de Fanconi.....	28
2.5.5 Correlació genotip-fenotip: localització de mutacions.....	28
2.6 VARIANTS D'EFFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT.....	30
3 PATOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI	32
3.1 MECANISMES D'INACTIVACIÓ AL·LÈLICA DE <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	32
3.1.1 Hipòtesi dels "two hits" de Knudson.....	32
3.1.2 Mutacions somàtiques en <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	33
3.1.3 Pèrdua al·lèlica en els loci <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	34
3.1.4 Inactivació de <i>BRCA1</i> : metilació del promotor.....	34
3.1.5 Inactivació de <i>BRCA2</i> : la proteïna EMSY.....	35
3.1.6 Haploinsuficiència.....	35

3.2	CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DELS TUMORS <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	36
4	ALTRES GENS DE SUSCEPTIBILITAT AL CÀNCER DE MAMA	38
4.1	GENS DE PENETRÀNCIA ALTA O MODERADA.....	39
4.2	GENS DE BAIXA PENETRÀNCIA I FACTORS MODIFICADORS.....	41
4.2.1	<i>El model poligènic</i>	41
4.2.2	<i>Gens modificadors del risc en portadors de mutacions en BRCA1 o BRCA2</i>	43
4.2.3	<i>Factors modificadors no genètics</i>	45
5	CONSELL GENÈTIC EN EL CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI	46
5.1	SELECCIÓ DE LES FAMÍLIES I PACIENTS.....	46
5.2	INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS DE LES PROVES GENÈTIQUES.....	49
	OBJECTIUS	51
	MATERIAL I MÈTODES	55
1	CARACTERÍSTIQUES DE LA MOSTRA SELECCIONADA.....	57
2	DETECCIÓ DE MUTACIONS GERMINALS EN <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	57
2.1	ANÀLISI CONFORMACIONAL DE POLIMORFISMES DE CADENA SENZILLA (SSCP).....	58
2.2	ANÀLISI DE LA PROTEÏNA TRUNCADA (PTT).....	59
3	CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS RECURRENENTS: ANÀLISI DE L'HAPLOTIP.....	59
4	ESTUDI DE VARIANTS D'EFFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT.....	61
4.1	ANÀLISI DE L'RNA DE PORTADORS.....	61
4.2	AVALUACIÓ TEÒRICA D'ALTERACIONS EN L' <i>SPLICING</i>	62
4.3	DETECCIÓ DE PÈRDUA AL·LÈLICA MITJANÇANT L'ANÀLISI DE MARCADORS MICROSATÈL·LITS.....	63
	RESULTATS	65
1	DETECCIÓ DE MUTACIONS EN ELS GENS <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	67
1.1	CONDITIONS FOR SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) ANALYSIS IN <i>BRCA1</i> GENE IN AN AUTOMATED SYSTEM Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2001; 39: 401-404.....	67
1.2	<i>BRCA2</i> MUTATION ANALYSIS OF 87 SPANISH BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES Annals of Oncology 2001; 12:1699-1703.....	69
2	CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS RECURRENENTS	71
2.1	THE R71G <i>BRCA1</i> IS A FOUNDER SPANISH MUTATION AND LEADS TO ABERRANT SPLICING OF THE TRANSCRIPT Human Mutation 2001; 17:520-521.....	71
2.2	HAPLOTYPE ANALYSIS OF THE <i>BRCA2</i> 9254delATCAT RECURRENT MUTATION IN BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES ORIGINATED FROM SPAIN Human Mutation 2003; 21:452.....	73

2.3	ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO EN PORTADORES DE LA MUTACIÓN 6857delAA EN EL GEN BRCA2 EN 4 FAMILIAS CON CÁNCER DE MAMA/OVARIO HEREDITARIO Medicina Clínica 2004; 123:543-545.....	75
3	ESTUDI DE VARIANTS D'EFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT.....	77
	RNA ANALYSIS OF EIGHT BRCA1 AND BRCA2 UNCLASSIFIED VARIANTS IDENTIFIED IN BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES FROM SPAIN Human Mutation 2003; 22:337.....	77
	ANNEX DE RESULTATS.....	79
	ANALYSIS OF BRCA1 AND BRCA2 GENES IN SPANISH BREAST/OVARIAN CANCER PATIENTS: A HIGH PROPORTION OF MUTATIONS UNIQUE TO SPAIN AND EVIDENCE OF FOUNDER EFFECT Human Mutation 2003; 22:301-312.....	81
	DISCUSSIÓ.....	83
1	ANÀLISI DE MUTACIONS EN ELS GENS <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>.....	85
1.1	MUTACIONS IDENTIFICADES EN <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i>	85
1.2	FREQÜÈNCIA DE MUTACIONS EN FAMÍLIES AMB CÁNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.....	91
1.3	FREQÜÈNCIA DE MUTACIONS EN PACIENTS SENSE HISTÒRIA FAMILIAR.....	97
1.4	CORRELACIONS GENOTIP – FENOTIP.....	98
1.5	ALTRES NEOPLÀSIES EN FAMÍLIES AMB MUTACIÓ	99
2	MUTACIONS RECURRENENTS	101
2.1	MUTACIONS RECURRENENTS EN POBLACIÓ ESPANYOLA.....	101
2.2	CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS RECURRENENTS: ANÀLISI DE L'HAPLOTIP.....	103
2.3	APLICACIONS DE L'ESTUDI DE MUTACIONS RECURRENENTS.....	104
3	ESTUDI DE VARIANTS D'EFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT.....	106
3.1	ESTUDIS DEL mRNA: EFECTES EN L' <i>SPLICING</i>	106
3.2	AVALUACIÓ TEÒRICA D'ALTERACIONS EN L' <i>SPLICING</i>	109
	CONCLUSIONS.....	111
	BIBLIOGRAFIA.....	115

INTRODUCCIÓ

1 BASES GENÈTIQUES DEL CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI

1.1 ANTECEDENTS HISTÒRICS DEL CÀNCER DE MAMA FAMILIAR

Les primeres descripcions científiques sobre l'agrupament de casos de càncer de mama en algunes famílies van aparèixer a mitjans del segle XIX. Gràcies al desenvolupament de la genètica molecular i a la seva influència en l'àmbit de la medicina, a principis dels anys 90 es va assumir l'existència d'una **predisposició heretada** al càncer de mama, que explicaria la presència de nombrosos casos en una mateixa família.

Els primers estudis epidemiològics per determinar la influència de la **història familiar** en el risc de patir càncer de mama comparaven la seva incidència en parents de persones afectes amb la d'un grup control. D'aquesta manera es va poder objectivar l'agrupament no casual de casos en una mateixa família (Lynch *et al.*, 1981). Posteriorment, en un treball realitzat a partir d'una base de dades de més de 4.000 individus de l'estat de Utah (EEUU) (Slattery i Kerber, 1993), es va estimar que l'increment de risc apareixia fins i tot amb antecedents familiars de tercer grau, encara que en menor mesura: de **2,45** vegades per les dones amb familiars de primer grau amb càncer de mama, d'**1,82** si el familiar era de segon grau i d'**1,35** si era de tercer grau.

L'existència d'antecedents familiars de càncer de mama és un factor de risc important i demostrat, però cal tenir en compte que pot ser deguda també a factors ambientals compartits entre membres d'una mateixa família. En aquest sentit, s'ha calculat que, del total de casos de càncer de mama, el **80-85%** són esporàdics, el **15-20%** corresponen a casos d'agregació familiar i d'aquests, entre el **5** i el **10%** són hereditaris (Nagy *et al.*, 2004). Alguns dels **factors ambientals** que podrien afavorir l'agregació familiar de casos són l'exposició a determinats carcinògens i diversos factors de risc de tipus reproductiu (nul·liparitat, edat avançada al primer fill, etc.) o d'estil de vida (manca d'exercici, sobrepès en l'adolescència, etc.).

1.2 IDENTIFICACIÓ DELS PRINCIPALS GENS DE SUSCEPTIBILITAT MAJOR AL CÀNCER DE MAMA: *BRCA1* I *BRCA2*

L'estudi de 200 arbres familiars mitjançant un model estadístic va proporcionar la primera evidència de l'existència d'almenys un gen dominant de susceptibilitat al càncer de mama (Williams *et al.*, 1984). Estudis posteriors van corroborar les dades inicials (Newman *et al.*, 1988), però no va ser fins el 1990 en què aquesta hipòtesi va ser provada, al descriure's el lligament del càncer de mama precoç al cromosoma 17q12 (Hall *et al.*, 1990). El 1994 Miki i el seu equip van clonar el gen ***BRCA1*** (***Breast Cancer 1***) (OMIM, 113705; GenBank, U14680) i van construir el mapa transcripcional d'una regió de 600 kb a **17q12**, després d'haver trobat mutacions que segregaven amb susceptibilitat als càncers de mama i d'ovari lligada a 17q (Miki *et al.*, 1994). Tot i la identificació del gen, només el 45% de les famílies amb càncer de

mama precoç mostraven evidències de lligament a *BRCA1*, de manera que la recerca d'altres gens de susceptibilitat va continuar. El 1994, Wooster i els seus col·laboradors van realitzar anàlisis de lligament en famílies amb múltiples casos de càncer de mama no associades a *BRCA1* i van trobar cosegregació de la malaltia amb marcadors del cromosoma **13q** (Wooster *et al.*, 1994). El 1995 van clonar el segon gen de susceptibilitat major al càncer de mama, el gen ***BRCA2* (*Breast Cancer 2*)** (OMIM, 600185; GenBank U43746) (Wooster *et al.*, 1995).

Les mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* són la principal causa hereditària del càncer de mama i donen lloc a la **síndrome de càncer de mama i ovari hereditari (CMOH)**, caracteritzada per la presència de casos de càncer de mama i ovari en una mateixa família o de múltiples casos de càncer de mama precoç.

Pocs anys després del descobriment dels gens, el fet que moltes famílies amb CMOH no presentessin cap mutació ni en *BRCA1* ni en *BRCA2* va impulsar la recerca d'un nou gen d'alta penetrància (un possible "***BRCA3***"). Aquesta recerca, però, fins al moment ha estat força decebedora. Dos *loci* addicionals han estat implicats en la susceptibilitat al càncer de mama: un en el cromosoma **8p** (Seitz *et al.*, 1997a i b) i l'altre, a **13q** (Kainu *et al.*, 2000). Estudis posteriors, no han confirmat el lligament (Rahman *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002a).

1.3 ESTRUCTURA DELS GENS *BRCA1* I *BRCA2*

El gen ***BRCA1*** es localitza al braç llarg del cromosoma 17, a la regió **17q12**. És un gen de grans dimensions format per **5.592 nucleòtids** que es distribueixen en **24 exons** (dos d'ells no traduïbles, l'1 i el 4). El 60% de la seqüència codificadora correspon a l'exó 11. *BRCA1* s'estén en una regió de **84 kb** de DNA genòmic (figura 1A), amb una elevada densitat de repeticions *Alu* (42%) i repeticions no-*Alu* (5%) (figura 1B) (Smith *et al.*, 1996), que el fan relativament inestable i susceptible de patir delecions i reordenaments. La llargada dels introns varia des de 403 pb fins a 9,2 kb i conté tres marcadors microsatèl·lits intragènics: D17S1323, D17S1322 i D17S855, localitzats en els introns 12, 19 i 20, respectivament. Els 22 exons codificants es transcriuen a un RNA de 7,8 kb, que es tradueix a una proteïna de 1.863 aminoàcids (Miki *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996).

El gen ***BRCA2*** es localitza en la regió **13q12** del cromosoma 13 i és encara més gran que *BRCA1*. La seva estructura genòmica s'estén en una regió de **86 kb** (figura 1C). Conté **11.385 nucleòtids**, repartits en **27 exons**, el primer dels quals no es tradueix. Els exons 10 i 11, d'uns 1.000 i 5.000 nucleòtids respectivament, constitueixen el 60% de la seqüència traduïble. El 47% de la regió genòmica de *BRCA2* és DNA repetit, que consisteix en un 20% de seqüències *Alu* i un 27% de DNA repetit tipus LINE i MER (figura 1D). El transcrit resultant dels 26 exons codificants conté unes 12 kb i la proteïna sintetitzada, 3.418 aminoàcids (Wooster *et al.*, 1995).

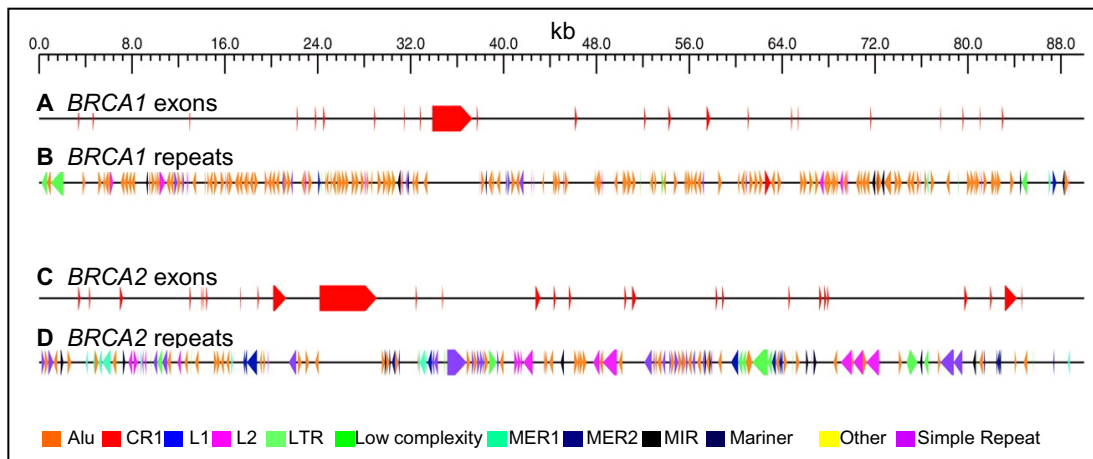


Figura 1 Seqüències repetides en els gens *BRCA1* i *BRCA2*. (A) Estructura genòmica del gen *BRCA1*. (B) Distribució dels elements repetits en el gen *BRCA1*, que representen el 47% del gen. (C) Estructura genòmica del gen *BRCA2*. (D) Distribució dels elements repetits en el gen *BRCA2*, que constitueixen el 48% del gen. Tret de Welcsh i King, 2001.

S'han identificat gens homòlegs de *BRCA1* i *BRCA2* en diversos organismes, alguns dels quals es mostren en la taula 1. Tant un com l'altre estan conservats en els amniotes, grup de vertebrats que inclou rèptils, ocells i mamífers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=homologene>).

Taula 1 Gens homòlegs de *BRCA1* i *BRCA2*.

Espècie	Homòlegs de <i>BRCA1</i>	Homòlegs de <i>BRCA2</i>
<i>Pan troglodytes</i> (ximpanzé)	BRCA1	LOC452526
<i>Canis familiaris</i> (gos)	BRCA1	BRCA2
<i>Mus musculus</i> (ratolí)	Brca1	Brca2
<i>Rattus norvegicus</i> (rata)	LOC497672	497682 (mRNA gene)
<i>Gallus gallus</i> (gall)	BRCA1	BRCA2

1.4 CARACTERÍSTIQUES DE LES PROTEÏNES BRCA1 I BRCA2

1.4.1 *BRCA1*: estructura, localització cel·lular i interacció amb altres proteïnes

Estructura

El producte del gen *BRCA1* és una fosfoproteïna de **1.863 aminoàcids**, amb un pes molecular aproximat de **220 kDa**. En la figura 2 es representa l'estructura de *BRCA1*, així com els llocs d'unió de diverses proteïnes.

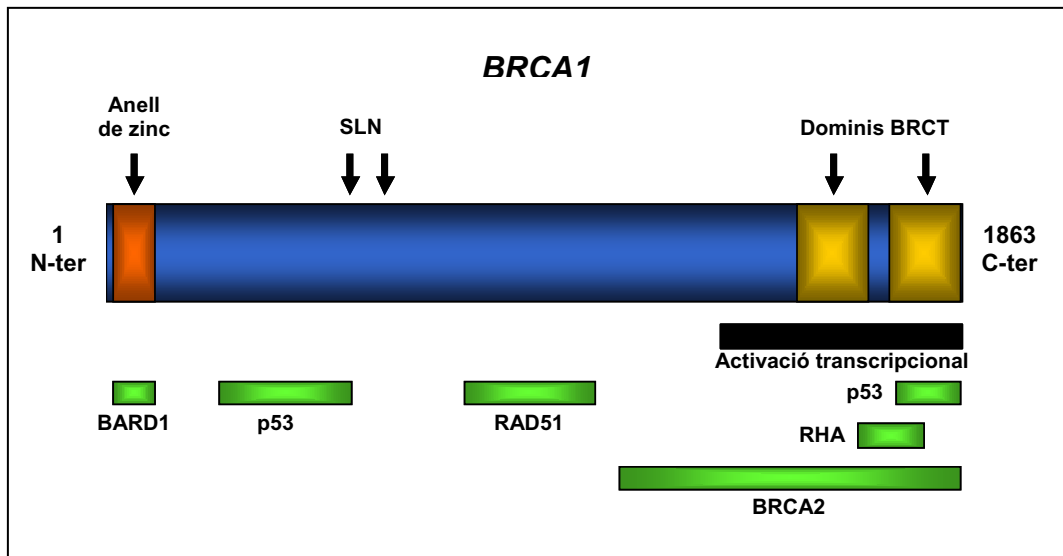


Figura 2 Estructura de la proteïna BRCA1 i llocs d'unió a altres proteïnes. Modificat de Yoshida i Miki, 2004.

En la regió N-terminal (aminoàcids 1-112), BRCA1 presenta un domini en **anell de zinc**, el qual es troba en moltes proteïnes que desenvolupen la seva funció a través de la unió al DNA (Saurin *et al.*, 1996). En aquest sentit, BRCA1 conté dos senyals de localització nuclear (**SLN**), que indiquen que la proteïna actua dins el nucli.

En la regió C-terminal, BRCA1 conté un domini acídic globular, d'uns 95 aminoàcids i repetit en tàndem, anomenat **BRCT** (*BRCA1 Carboxy-Terminal domain*). Aquest domini va ser identificat mitjançant diverses estratègies computacionals per Koonin *et al.* (1996). Posteriorment, es va definir una superfamília de proteïnes amb dominis BRCT, implicades en la recombinació i la reparació del DNA i el control del cicle cel·lular (Bork *et al.*, 1997, Callebaut i Mornon, 1997).

A part d'aquests dominis, BRCA1 no presenta homologia amb cap altra proteïna coneguda i està poc conservada entre espècies de mamífers. Per exemple, la identitat de seqüència de la proteïna BRCA1 humana amb Brca1 de ratolí és del 56%. El fet que les característiques i estructures abans esmentades, però, estiguin també presents en la seqüència de les proteïnes corresponents de gos, rata i ratolí, suggereix que aquestes regions són importants per la funció BRCA1 (Abel *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1995; Sharan *et al.*, 1995; Szabo *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1999).

El producte proteic del gen *BRCA1* que acabem de descriure és el més abundant, però no l'únic que existeix. El mRNA de *BRCA1* presenta un fenomen d'**splicing alternatiu** que condueix a l'aparició de diversos transcrits madurs que conserven el marc de lectura. Tot i que se n'han descrit aproximadament una vintena, fins al moment només s'han identificat tres isoformes proteiques corresponents (figura 3).

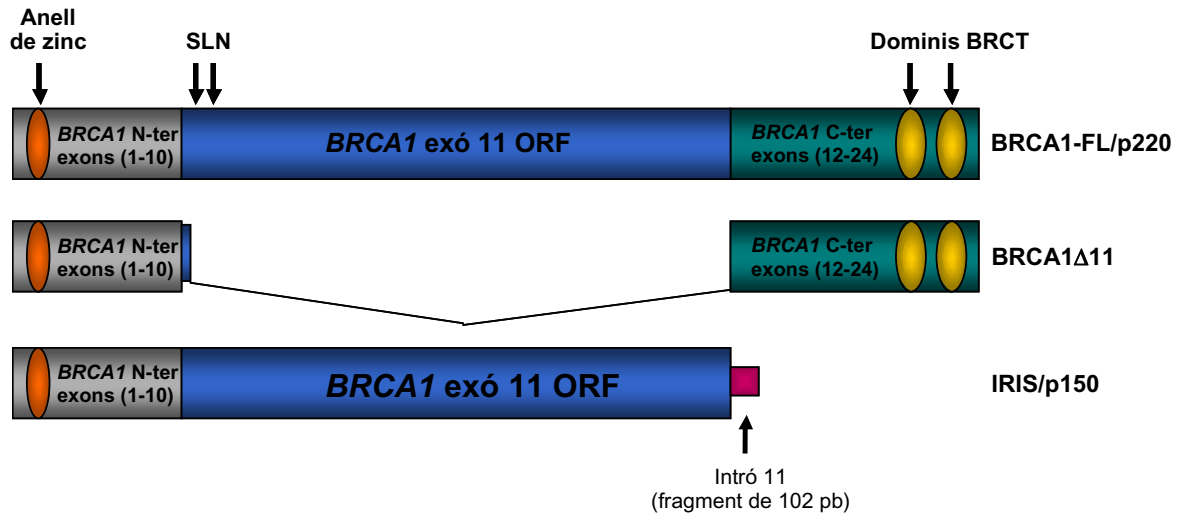


Figura 3 Esquema de les isoformes naturals de *BRCA1* identificades. Tret d'ElShamy i Livingston, 2004.

La isoforma de **1.863** aminoàcids s'anomena **BRCA1-FL** (*full-length*) o **p220** i conté totes les regions corresponents al marc de lectura obert (ORF, d'*Open Reading Frame*) del mRNA de *BRCA1*, que comença en el codó d'iniciació de la transcripció en l'exó 2 i acaba en el codó de terminació, en l'exó 24. El 1997 Wilson i el seu equip van identificar un producte de **760** aminoàcids, anomenat **BRCA1Δ11**, que conté totes les seqüències de l'ORF de p220 excepte una regió corresponent a gairebé tot l'exó 11 (residus 263-1364) (Wilson *et al.*, 1997). Per últim, recentment s'ha descobert la isoforma **BRCA1-IRIS** (p150) (ElShamy i Livingston, 2004), de **1.399** aminoàcids, codificada per un ORF ininterromput que comença en el mateix codó que BRCA1-FL però acaba en un punt de terminació situat 34 triplets dins l'intró 11. A diferència de BRCA1Δ11, que és poc abundant i no se li coneix cap funció específica, ElShamy i Livingston suggereixen que BRCA1-IRIS podria desenvolupar una funció important per la cèl·lula, relacionada amb la replicació, diferent a la de BRCA1-FL.

Localització cel·lular

Inicialment, la identificació d'una seqüència de tipus **granina** en BRCA1 i estudis d'immunolocalització van suggerir que BRCA1 era una proteïna citoplasmàtica, amb possibilitat de ser **secretada** a l'exterior extracel·lular (Jensen *et al.*, 1996). Actualment, arran de les observacions realitzades amb nous anticossos i en nombrosos estudis sobre la interacció amb altres proteïnes i sobre les seves possibles funcions (Chen *et al.*, 1996; Ruffner i Verma, 1997; Scully *et al.*, 1997a i b), es considera que la localització de la proteïna és primordialment **nuclear**. En aquest sentit, ha estat clau la caracterització de dos senyals de localització nuclear (**SLN**) en l'exó 11 de BRCA1 (Chen *et al.*, 1996). Estudis recents, però, mostren que aquests SLN no serien indispensables per una localització nuclear de BRCA1 i suggereixen la presència d'un senyal de localització nuclear críptic (no clàssic), entre els 300 primers aminoàcids de la proteïna (Fan *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2001).

Interacció amb altres proteïnes

Tal i com demostren diversos assaigs d'unió *in vitro* i d'associació *in vivo*, BRCA1 és una proteïna de grans dimensions i és capaç d'experimentar una gran quantitat d'interaccions proteiques, que podrien contribuir en les seves funcions biològiques (taula 2). En la figura 2 es representen esquemàticament algunes d'aquestes interaccions.

Taula 2 Proteïnes d'unió a BRCA1 i les seves funcions. Tret de Welcsh i King, 2001.

Proteïna o complex d'unió	Funció de la proteïna d'unió	Domini de BRCA1 (residus aa) d'unió a la proteïna
RAD51	Reparació talls de doble cadena	Exó 11 (758–1064)
RAD50	Reparació talls de doble cadena	Exó 11 (341–748)
BRCA2	Reparació talls de doble cadena	BRCT (1314–1863)
BASC (ATM, BLM, MSH2, MSH6, MLH1, RCF)	Reparació errors aparellament	BRCA1 forma part del complex
ATP-MSH2	Reparació errors aparellament	?
H2AX	Sensor del dany al DNA	?
p53	Factor transcripció, supressor tumoral	Exó 11 (224–500) i BRCT (1760–1863)
RB	Regulador cicle cel·lular, supressor tumoral	Exó 11 (304–394) i BRCT (1536–1863)
MYC	Factor transcripció, oncoproteïna	N-terminal (175–303) i exó 11 (433–511)
ZBRK1	Factor transcripció, inhibidor de GADD45	Exó 11 (341–748)
ATF	Factor transcripció	Anell zinc (1–101)
STAT1	Transductor senyals, activador transcripcional	Exó 11 (502–802)
E2F	Factor transcripció, regulador cicle cel·lular	N-terminal (1–76)
Holoenzim RNA Pol II (RHA, RPB10 α , RPB2)	Transcripció	BRCT (1650–1800)
ER	Factor de transcripció depenent de lligand	Extrem N-terminal (1–300)
AR	Factor de transcripció depenent de lligand	Exó 11 (758–1064) i BRCT (1314–1863)
CtIP	Uneix CtBP, corepressor transcripcional	BRCT (1651–1863)
p300/CBP	Coactivador transcripcional.	Anell zinc (1–303) i BRCT (1314–1863)
SWI/SNF	Complex de remodelació de la cromatina	Exó 11 (260–553)
HDAC 1 i 2	Desacetilació histones, remodelació cromatina	BRCT (1563–1863)
Centrosoma (p53, pRB, Nm23)	Segregació cromosòmica	BRCA1 forma part del complex
BRAP2	Retenció citoplasmàtica	SLN (303–701)
VCP	ATPasa	Exó 11 (303–625)
BARD1	Ubiquitinització, poliadenilació via CstF-50?	Anell zinc (1–101)
BAP1	Enzim desubiquitinitzador	Anell zinc (1–100)
Importina α	Transport nuclear	SLN (303–701)

Un dels dominis més ben caracteritzats de BRCA1 és l'anell de zinc N-terminal. Aquests tipus de dominis presenten un patró conservat de cisteïnes i histidines i fan de mitjancers entre proteïnes o proteïna i DNA. Moltes proteïnes que formen part de macrocomplexos contenen un anell de zinc i, algunes d'elles, faciliten la ubiquitinització (Lorick *et al.*, 1999). Aquesta regió és el lloc d'heterodimerització de BRCA1 i **BARD1** (*BRCA1-Associated RING Domain 1*) i d'unió a l'enzim de desubiquitinització **BAP1** (*BRCA1-Associated Protein 1*).

En l'exó 11, els dos senyals de localització nuclear uneixen **importina- α** i, en regions properes, s'hi troben llocs d'unió a proteïnes de gens supressors tumorals (com **p53** i la proteïna del retinoblastoma, **RB**) i a l'oncoproteïna **MYC**. A més, s'hi uneix **RAD50**, la qual forma part del complex **MRN** (RAD50/MRE11/NBS1). Un domini comprès entre els aminoàcids 758 i 1064 interacciona amb la recombinasa **RAD51**.

Pels dominis BRCT a C-terminal, BRCA1 interacciona amb BRCA2 i, juntament amb RAD51, formen un altre complex implicat en la reparació del DNA. A més, BRCA1 interacciona amb diverses proteïnes implicades en la regulació de la transcripció: components de l'**holoenzím RNA polimerasa II** (com la RNA helicasa A, **RHA**), el complex de remodelació de la cromatina **SWI/SNF**, el corepressor transcripcional **CtIP** i les desacetilases d'histones **HDAC1** i **HDAC2**.

1.4.2 BRCA2: estructura, localització cel·lular i interacció amb altres proteïnes

Estructura

El producte del gen *BRCA2* és una proteïna de **3.418 aminoàcids** i un pes molecular estimat de **384 kDa** (figura 4). BRCA2 presenta molt poca similitud amb altres proteïnes conegudes, excepte algunes semblances estructurals amb BRCA1, com ara un llarg exó 11.

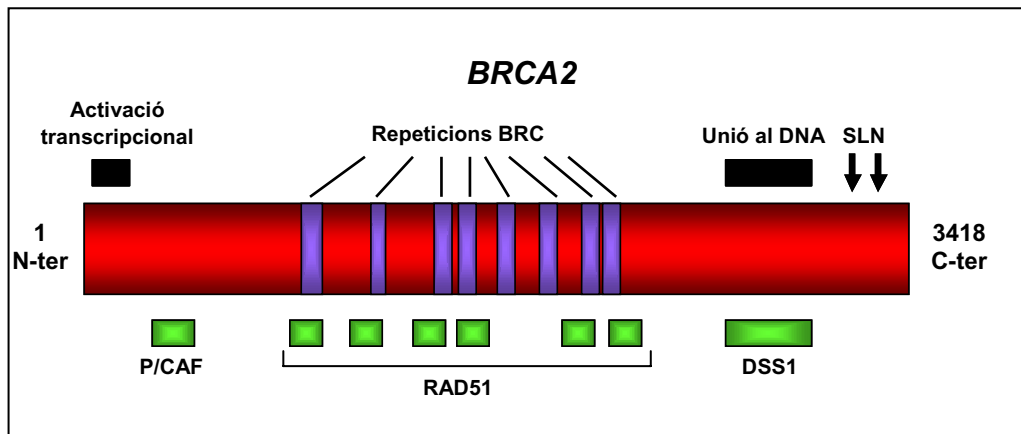


Figura 4 Estructura de la proteïna BRCA2 i llocs d'unió a altres proteïnes.

En la regió N-terminal de BRCA2 s'hi troba el domini d'**activació transcripcional**, mentre que l'exó 11 conté vuit repeticions d'un motiu de 30 a 80 aminoàcids (**BRC**), força conservades evolutivament a moltes espècies de mamífers (Bignell *et al.*, 1997), així com un **domini d'unió al DNA** (Yang *et al.*, 2002). Per últim, en l'extrem C-terminal BRCA2 conté dos **SLN**.

Com BRCA1, BRCA2 està poc conservada entre les diferents espècies de mamífers. La identitat de seqüència de la proteïna BRCA2 humana amb Brca2 de ratolí, per exemple, és només del 57%.

Localització cel·lular

Encara que la localització de la proteïna BRCA2 no ha estat tan investigada com la de BRCA1, s'ha observat també en el **nucli** (Marmorstein *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998a). Recentment, s'han descrit dos **SLN** en l'extrem C-terminal del gen *BRCA2* (Spain *et al.*, 1999; Yano *et al.*, 2000). Malgrat això, diverses observacions mostren que, com BRCA1, la regió N-terminal de BRCA2 és suficient per la seva localització nuclear (Moynahan *et al.*, 2001; Sarkisian *et al.*, 2001).

Interacció amb altres proteïnes

Es coneixen menys proteïnes d'unió a BRCA2 que en el cas de BRCA1 (taula 3).

Taula 3 Proteïnes d'unió a BRCA2 i les seves funcions. Modificat de Welch i King, 2001.

Proteïna d'unió	Funció de la proteïna d'unió	Domini de BRCA2 (residus aa) d'unió a la proteïna
RAD51	Reparació talls doble cadena	Exó 11 repeticions BRC (1009–2083)
BRCA1	Manteniment estabilitat del genoma	?
P/CAF	Acetilació d'histones, remodelació	N-terminal (290–453)
BRAF-35	Progressió del cicle cel·lular	Exó 11 repeticions BRC 6–8 (1648–2190)
DSS1	? (delecionat en <i>split hand/split foot</i>)	Exó 11 (2472–2957)

Per l'extrem N-terminal, BRCA2 interacciona amb **P/CAF** (*p300/CBP-Associated Factor*), proteïna amb activitat acetilasa d'histones. En l'exó 11, on es localitzen els motius **BRC**, s'hi uneixen **RAD51** i **BRAF35** i, en el domini d'unió al DNA, la proteïna **DSS1**.

1.4.3 Expressió de BRCA1 i BRCA2

Patró d'expressió durant el desenvolupament

Els gens *BRCA1* i *BRCA2* s'expressen en **nombrosos teixits humans**, amb més intensitat al timus i testicles (Miki *et al.*, 1994; Tavtigian *et al.*, 1996). La regulació de la seva expressió ha estat estudiada més exhaustivament en ratolí. Ambdues proteïnes són necessàries per la **proliferació cel·lular** durant les primeres fases de l'**embriogènesi** i per la proliferació de les cèl·lules de la glàndula mamària en la **pubertat** i l'**embaràs** (Rajan *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997), etapes en què s'observen quantitats elevades de mRNA tant de *Brca1* com de *Brca2*. El fet que durant aquestes tres fases del desenvolupament s'observin també elevades concentracions d'**estrògens** en teixit mamari i ovàric, suggereix el seu paper estimulador de l'expressió de *BRCA1* i *BRCA2*.

Variació amb el cicle cel·lular i fosforilació

Diversos estudis fets en cèl·lules de l'epiteli mamari humanes, tant normals com canceroses, mostren que l'expressió de *BRCA1* i *BRCA2* s'indueix just abans de l'entrada en la fase **S**, quan hi ha la màxima diferenciació i creixement cel·lulars (Gudas *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). En **cèl·lules mitòtiques**, durant la fase **S**, **BRCA1**, **BRCA2** i **RAD51** interaccionen i es colocalitzen en el nucli a les regions cromosòmiques que duen a terme la replicació del DNA, marcades amb l'antigen nuclear de proliferació cel·lular (**PCNA**, de *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Scully *et al.*, 1997c), mentre que en **cèl·lules meiótiques** les tres proteïnes s'associen amb elements axials al llarg dels complexos sinapteinemals (Scully *et al.*, 1997c; Chen *et al.*, 1998b).

La funció de *BRCA1* i *BRCA2* es regula per **fosforilació** durant la progressió del cicle cel·lular i, com s'explica amb més detall en l'apartat 1.5.3, en resposta al dany al DNA. **BRCA1** és **hiperfosforilada** al final de la fase G1 i en la fase S (coincidint amb l'augment d'expressió) i és desfosforilada a la fase M (Ruffner *et al.*, 1999). De forma contrària, estudis recents mostren que la forma activa de **BRCA2** seria la **desfosforilada** (Lin *et al.*, 2003; Esashi *et al.*, 2005). Així, *BRCA2* és hiperfosforilada en la fase M i comença a desfosforilar-se quan la cèl·lula abandona la fase M i entra en la interfase. Els resultats d'aquests treballs mostren que una *BRCA2* fosforilada és incapaç d'unir-se a proteïnes importants per dur a terme la seva funció, com són P/CAF i RAD51.

Regulació de la transcripció dels gens *BRCA*

El promotor de ***BRCA1*** conté diverses regions que regulen la seva expressió a través de la unió de proteïnes activadores i repressores (Welch i King, 2001). Per exemple, la proteïna **Id4** (*Inhibitor of DNA binding 4*) inhibeix l'expressió de *BRCA1* (Beger *et al.*, 2001). La sobreexpressió d'Id4 s'associa a un creixement cel·lular independent d'ancoratge, característica fonamental de les cèl·lules tumorals. En les cèl·lules mamàries normals els **estrògens** redueixen l'expressió d'Id4, augmentant-se així l'expressió de *BRCA1*. Segons els autors, les cèl·lules de l'epiteli mamari sense receptors d'estrògens (ER, d'*Estrogen Receptor*) (ER-) serien insensibles a aquesta regulació negativa i sobreexpressarien Id4, expressarien poc *BRCA1* i presentarien un creixement independent d'ancoratge.

D'altra banda, **NF- κ B** activa la transcripció de ***BRCA2*** (Wu *et al.*, 2000). Aquest factor de transcripció regula l'expressió de gens amb papers crítics per l'apoptosi, la tumorigènesi i la inflamació i estimula la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules tumorals mamàries ER- (Biswas *et al.*, 2000).

1.5 FUNCIONS DE LES PROTEÏNES BRCA1 I BRCA2

BRCA1 i BRCA2 són proteïnes de grans dimensions que interaccionen amb un elevat nombre d'altres proteïnes. A més, presenten un patró d'expressió i una localització cel·lular similars. Tot plegat suggereix que les proteïnes BRCA exerceixen múltiples funcions biològiques, algunes d'elles comunes. De forma genèrica, participen en el **manteniment de l'estabilitat del genoma** en resposta al **dany al DNA**, protegint-lo en front de possibles danys **endògens** (com problemes en la replicació o l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen) o **exògens** (com la llum ultraviolada o la radiació ionitzant). Mentre que la funció de BRCA2 es limita bàsicament al propi procés de reparació de les lesions, BRCA1 respon al dany al DNA participant en vies cel·lulars responsables de la reparació, la transcripció i la regulació del cicle cel·lular (Scully i Livingston, 2000; Welch i King, 2001) (figura 5).

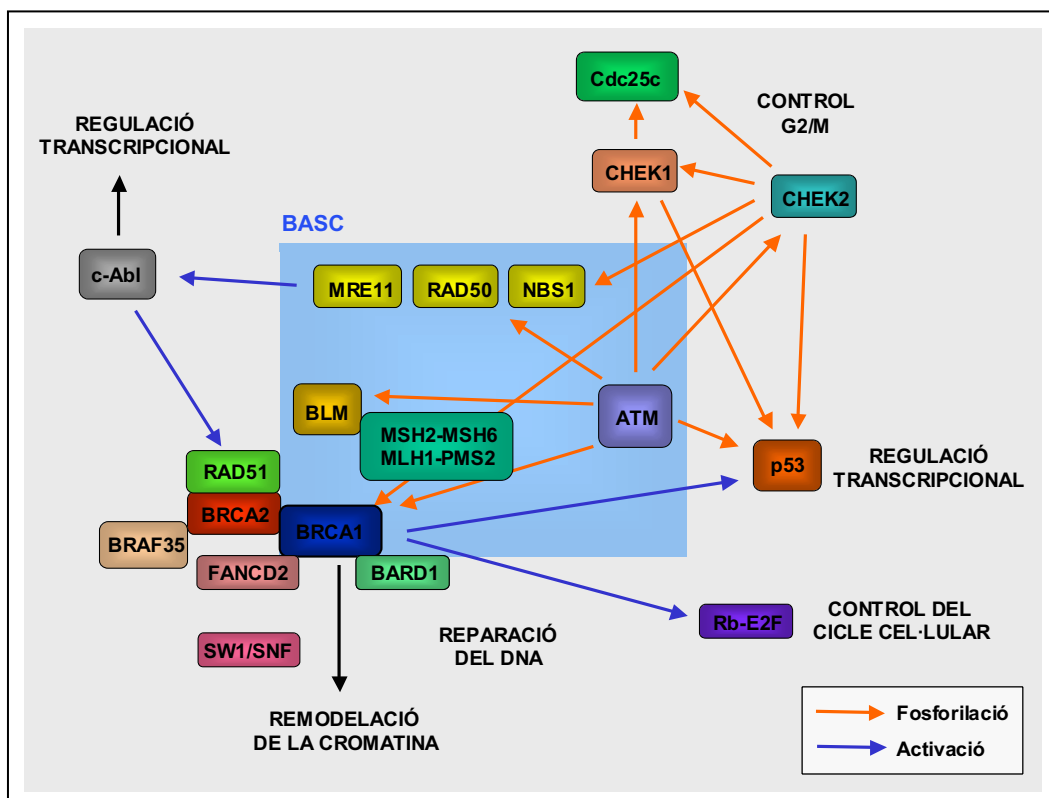


Figura 5 Múltiples funcions de la proteïna BRCA1 en resposta al dany al DNA. Quan es produeix una lesió al DNA, BRCA1 interacciona amb moltes altres proteïnes (com BRCA2) per regular la reparació del DNA, la transcripció i el cicle cel·lular.

BRCA1 està implicada en tots aquests processos principalment com a component del gran complex proteic **BASC** (*BRCA1-Associated genome Surveillance Complex*) (Wang *et al.*, 2000), que inclou proteïnes de detecció del dany al DNA (com l'ATM, d'*Ataxia Telangiectasia Mutated*) i múltiples proteïnes de reparació. Recentment, s'ha descobert que BRCA1 podria estar també implicada en la inactivació del cromosoma X (Ganesan *et al.*, 2002).

1.5.1 Reparació del DNA

El dany més nociu en el DNA, induït per radiació ionitzant, és l'aparició de trencaments de la doble cadena del DNA (**DSB**, de *Double Strand Breaks*). Les cèl·lules de mamífers presenten tres possibles mecanismes de reparació dels DSBs. La via més habitual, i també la més **precisa**, és la **recombinació homòloga (RH)**. Les altres dues vies, la **SSA** (*Single-Strand Annealing*) (un model de reparació per recombinació homòloga no conservativa) i la unió d'extremes no homòlegs (**NHEJ**, de *NonHomologous End-Joining*), són menys precises i es consideren **vies propenses a l'error**. En cèl·lules en les que no funciona la RH, la reparació del dany al DNA s'efectua per aquestes altres vies, apareixent anomalies cromosòmiques i inestabilitat genètica, ambdues característiques de les cèl·lules tumorals.

Diversos experiments en cèl·lules de rosegadors i de tumors humans amb BRCA2 no funcional indiquen que aquesta proteïna participa exclusivament en la RH (Moynahan *et al.*, 2001; Tutt *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2001). El paper principal de BRCA2 en la reparació dels DSBs mitjançant RH és a través del control de la recombinasa **RAD51**, l'homòleg eucariota de RecA (figura 6). *In vitro*, RAD51 polimeritza amb DNA de cadena senzilla i actua de mitjancer en les reaccions d'intercanvi i aparellament de cadenes entre DNA homòleg, una de les primeres fases de la RH (revisat per West *et al.*, 2003). En canvi, tot i que BRCA1 participa juntament amb BRCA2 i RAD51 en la RH, experiments en cèl·lules amb un *BRCA1* mutat suggereixen que la proteïna BRCA1 intervé també en la SSA i la NHEJ (Snouwaert *et al.*, 1999; Bau, 2005).

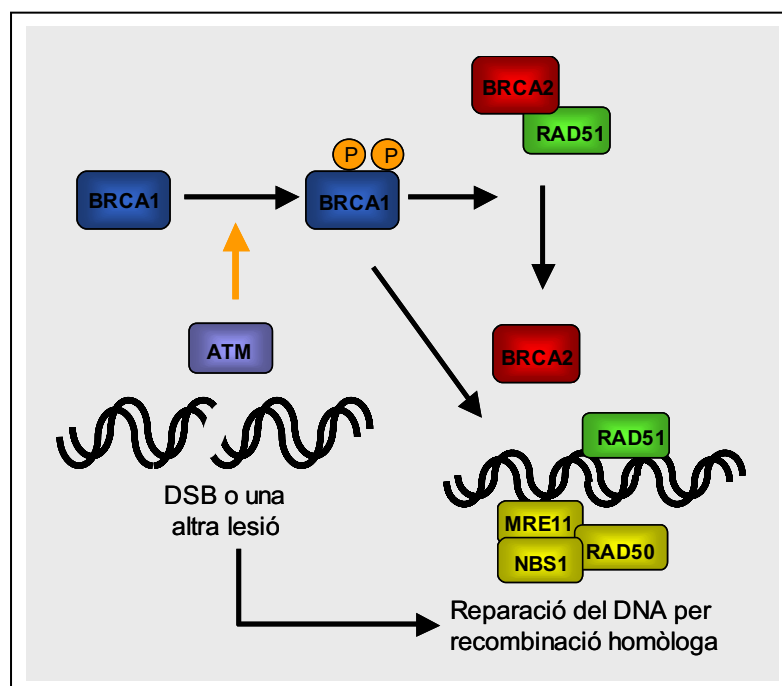


Figura 6 Model sobre el paper de les proteïnes BRCA en la reparació del DNA. Tret de Yoshida i Miki, 2004.

La funció de BRCA1 en la reparació és més general que la de BRCA2. BRCA1 representa un lligam entre els components sensors (com l'ATM) i els efectors (com el complex MRN, MRE11-RAD50-NBS1) de la resposta al dany al DNA, aconseguint que aquesta resposta sigui adequada a la lesió inicial (Yoshida i Miki, 2004). En la figura 6 es mostra el model proposat per Yoshida i Miki segons el qual, en resposta als trencaments de doble cadena, l'ATM fosforila BRCA1 i aquesta, juntament amb BRCA2 i RAD51, activa la reparació del DNA mitjançant la RH, amb el reclutament del complex MRN cap als llocs on hi ha les lesions, perquè siguin reparades.

D'altra banda, recentment s'ha descobert que **BRCA2** és idèntic a **FANCD1**, un membre del complex de proteïnes de l'anèmia de Fanconi (D'Andrea i Grompe, 2003). En resposta al dany al DNA, el complex FANC (format per les proteïnes A, C, E, F i G) activa la monoubiquitinització de **FANCD2**, que es trasllada als foci nuclears que contenen BRCA1, BRCA2 i RAD51. Tot plegat suggereix l'existència d'una via comuna FANC/BRCA de reparació del DNA.

1.5.2 Regulació de la transcripció

En resposta al dany al DNA, BRCA1 regula la transcripció de diversos gens implicats en la reparació i el control del cicle cel·lular. Per exemple, estudis basats en la tecnologia de *microarrays* mostren que una sobreexpressió de BRCA1 estimula la transcripció de **p53** i de factors de resposta a l'estrès com **p21** i **GADD45** (MacLachlan *et al.*, 2002) (figura 7).

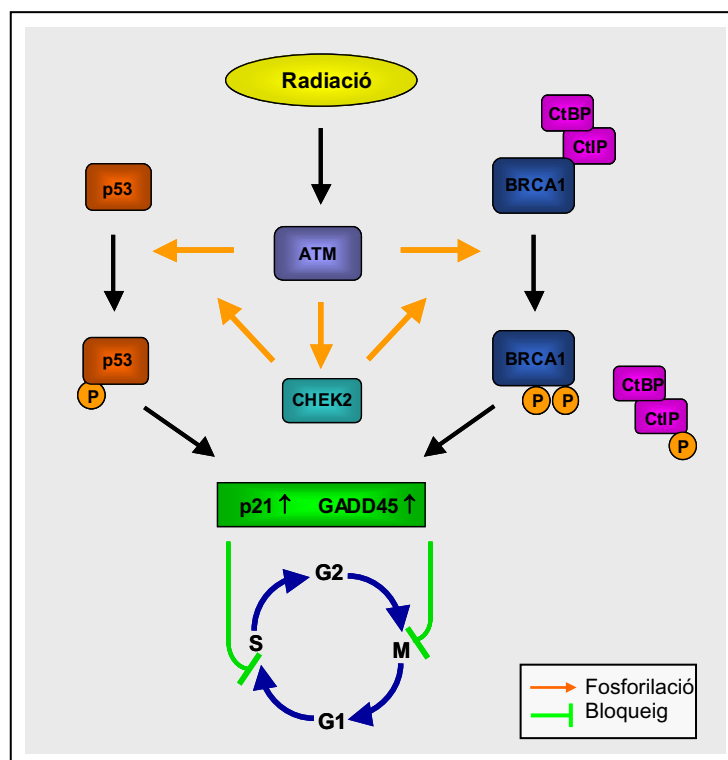


Figura 7 Paper de BRCA1 en la regulació de la transcripció després de l'exposició a radiació ionitzant. Tret de Yoshida i Miki, 2004.

La radiació ionitzant activa l'ATM, la qual fosforila CtIP per dissociar el complex CtIP-CtBP-BRCA1. L'alliberament de BRCA1 permet que aquest activi la transcripció de *p21* i *GADD45*, amb la conseqüent aturada del cicle cel·lular (en G1-S i G2-M), necessària perquè la lesió sigui reparada.

La capacitat de regulació transcripcional de **BRCA2** és menys coneguda. Estudis inicials van suggerir que el producte de l'**exó 3** de *BRCA2* (aminoàcids 18-105) activava la transcripció i que, com en BRCA1, mutacions en aquesta regió abolien aquesta capacitat (Milner *et al.*, 1997). Addicionalment, experiments posteriors van suggerir que l'activació de la transcripció per part de BRCA2 podria venir de la seva interacció amb proteïnes que participen en la remodelació de la cromatina.

1.5.3 Remodelació de la cromatina

La cromatina és l'estructura en la que s'organitza i s'empaqueta el DNA en el nucli de les cèl·lules eucariotes. La unitat primària és el nucleosoma, format per un octàmer d'histones i un fragment de DNA que embolcalla cada octàmer. La remodelació de la cromatina (o control de l'estructura cromatínica), es regula mitjançant diferents modificacions epigenètiques (metilació del DNA, acetilació/desacetilació i metilació d'histones) i el **complex de remodelació SWI/SNF**. L'**acetilació de les histones** fomenta una estructura oberta de la cromatina, fent el DNA més accessible a les proteïnes de reparació en els llocs on s'ha produït una lesió i facilitant la unió dels factors de transcripció en les regions promotores dels gens que s'han de regular (Lefebvre *et al.*, 1998). En aquest sentit, s'ha observat que els complexos activadors de la transcripció posseeixen funcions d'acetiltransferases d'histones (Kuo *et al.*, 1998), i que, contràriament, els complexos corepressors tenen activitat desacetilasa (Wong *et al.*, 1998).

Diversos estudis mostren que **BRCA1** interacciona amb el complex de remodelació de la cromatina **SWI/SNF** (Bochar *et al.*, 2000), amb enzims modificadors d'histones (**p300/CBP** i **HDAC**) (Yarden i Brody, 1999; Pao *et al.*, 2000) i amb helicases, com **BLM** i **BACH1** (Wang *et al.*, 2000; Cantor *et al.*, 2001). La observació que mutacions que predisposen al càncer redueixen l'afinitat de BRCA1 per aquestes proteïnes suggereix que la remodelació de la proteïna és un mecanisme important en la funció de BRCA1 com a supressor tumoral (Ye *et al.*, 2001).

D'altra banda, diversos experiments de transactivació *in vitro* van suggerir que la capacitat d'activació de la transcripció de **BRCA2** podia ser indirecta a través de la seva interacció amb **P/CAF** i **p300/CBP**, proteïnes amb capacitat acetiltransferasa d'histones (Fuks *et al.*, 1998; Scully i Livingston, 2000; Welcsh *et al.*, 2000). Addicionalment, altres autors han observat que la pròpia BRCA2 posseeix **activitat acetiltransferasa d'histones** (Siddique *et al.*, 1998). Recentment, s'ha descrit la interacció de BRCA2 amb una nova proteïna que intervé en el procés de remodelació de la cromatina: la proteïna **EMSY** (Hugues-Davies *et al.*, 2003). L'EMSY inhibeix l'activitat transcripcional de BRCA2 i s'ha suggerit que podria funcionar com un repressor transcripcional general.

1.5.4 Ubiquïtinització

Els dominis en anell de zinc, com el de BRCA1 N-terminal, freqüentment s'associen a una activitat ubiquïtina ligasa, la qual polimeritza ubiquïtina en una proteïna diana que és degradada al proteosoma. La interacció **BRCA1-BARD1** a través dels dominis en anell de zinc forma un heterodímer amb activitat ubiquïtina ligasa (Hashizume *et al.*, 2001). Els substrats de la degradació són poc coneguts, però podrien ser proteïnes nuclears implicades en la **reparació del dany al DNA** o la **transcripció**.

En relació amb això, **BRCA1** participa en la **reparació acoblada a la transcripció**, procés que atura la transcripció (desplaçant o degradant la RNA polimerasa) dels gens on s'ha produït una lesió perquè aquesta sigui reparada. Starita i Parvin (2003) proposen un model segons el qual, l'heterodímer BRCA1-BARD1 controlaria el manteniment de la integritat cromosòmica mitjançant l'exploració de gens actius associats a l'holoenzim de la **RNA polimerasa II** (figura 8).

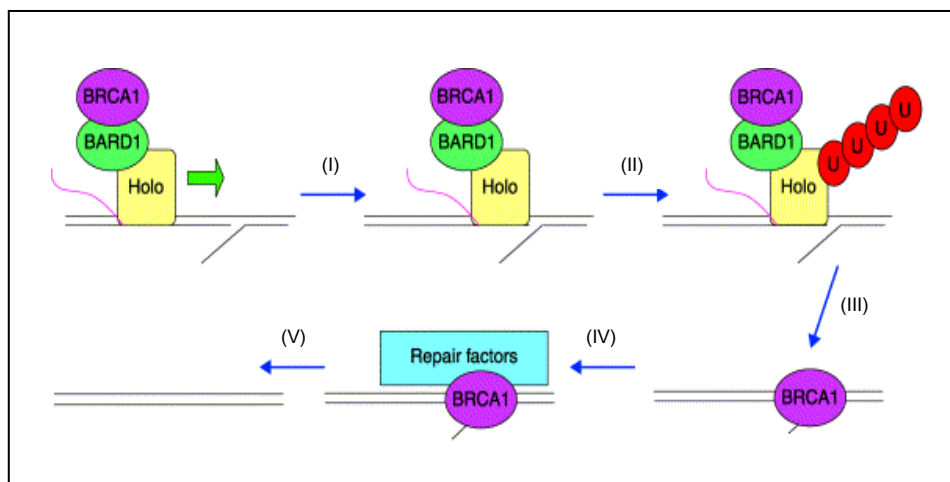


Figura 8 Model que relaciona la ubiquïtinització i altres funcions de BRCA1 amb el manteniment de l'estabilitat cromosòmica. Quan es localitza una lesió en el DNA (I), BRCA1 ubiquïtinitza l'holoenzim de la RNA polimerasa II, marcant-la així per a la seva destrucció (II). Aleshores, la lesió queda lliure perquè s'hi uneix BRCA1 (III) i atregui factors de reparació, com el complex MRE11-RAD50-NBS1 (IV). Finalment, la lesió és reparada (V). Extret de Starita i Parvin, 2003.

1.5.5 Control del cicle cel·lular

BRCA1 també ha estat implicada en la regulació dels sistemes de vigilància (**checkpoints**) del cicle cel·lular (Yarden *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001 i 2002). Aquest punts de control són essencials per la supervivència cel·lular perquè, aturant el cicle, eviten la propagació del dany i permeten la reparació de la lesió. Diversos estudis indiquen que BRCA1 controla principalment el punt **G2-M**, el qual evita que la cèl·lula entri en mitosi si hi ha un dany al DNA (Larson *et al.*, 1997).

Els mecanismes mitjançant els quals **BRCA1** regula diferents *checkpoints* podrien estar relacionats amb l'actuació de **quinases** de resposta al dany al DNA. El treball de Ruffner *et al.* (1999) mostra que BRCA1 és hiperfosforilada durant la fase G1 tardana i la fase S per complexos **CDK2-ciclina** que controlen la transició G1-S, i és desfosforilada a la fase M. D'altra banda, el paper de l'**ATM**, l'**ATR** i **CHEK2** fosforilant BRCA1 en resposta al dany al DNA, és un procés crític per la tumorigènesi. Quan es produeix un dany al DNA, l'ATM i les ATR (*ATM-Related kinases*) fosforilen BRCA1 en diverses serines crítiques (Cortez *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2004). Mentre que la resposta a les lesions degudes a radiació ionitzant podria estar controlada per l'ATM via CHEK2 (*Checkpoint Kinase 2*) (Lee *et al.*, 2000), l'activitat de l'ATR és independent de l'ATM i s'indueix per la llum ultraviolada o la hidroxidreurea. El mecanisme precís d'intervenció de **BRCA1 fosforilada** en els **checkpoints** es desconeix, però podria estar relacionat amb la regulació de la **transcripció** de diverses proteïnes de *checkpoints*, com *p21* i *GADD45* (figura 7).

Pel que fa a **BRCA2**, sembla que tindria un paper més indirecte en la regulació del cicle cel·lular. Estudis recents indiquen que BRCA2 podria participar en la regulació de la transició **G2-M** a través de la seva interacció amb la proteïna **BRAF35** (*BRCA2-Associated Factor 35*) (Marmorstein *et al.*, 2001). Els autors suggereixen que el complex BRCA2/BRAF35 podria regular la progressió de la metafase. Tot i que la regulació per **fosforilació** de **BRCA2** és menys coneguda que la de BRCA1, recentment s'ha descrit la fosforilació de la serina 3291 en l'extrem C-terminal de la proteïna per part de diverses **CDKs** (Esashi *et al.*, 2005). La fosforilació és baixa durant la fase S (quan la recombinació és activa) i augmenta a mesura que avança la mitosi, bloquejant la interacció entre BRCA2 i RAD51. Quan hi ha un dany al DNA, s'atura la progressió del cicle cel·lular i disminueix la fosforilació de BRCA2, de manera que s'afavoreix la formació del complex de reparació BRCA2-RAD51 (figura 6).

1.5.6 Les funcions BRCA i la susceptibilitat al càncer

El càncer és una malaltia deguda a alteracions genètiques. Al llarg de la vida, el DNA va acumulant canvis que poden activar protooncogens o inactivar gens supressors de tumors. La inestabilitat genètica que condueix a l'aparició del tumor augmenta degut al dany acumulat i a les deficiències dels sistemes de reparació. Com en altres gens involucrats en càncer hereditari, els al·lels de *BRCA1* i *BRCA2* que predisposen al càncer contenen mutacions que causen la pèrdua o la reducció de la funció del gen. La **predisposició** s'hereta a través de la línia germinal com un tret genètic **dominant**, mentre que l'**al·lel mutat** es comporta com a **recessiu** en les cèl·lules somàtiques. Per tant, amb la transmissió d'una sola còpia de l'al·lel mutat s'hereta la **predisposició**, mentre que la pèrdua o inactivació posterior de l'al·lel salvatge significa la **completa inactivació** de les funcions del gen.

Encara que com acabem de veure les proteïnes BRCA1 i BRCA2 han estat implicades en múltiples funcions cel·lulars, els mecanismes concrets que determinen la seva activitat **supressora de tumors** no estan definits. Els resultats de Yarden *et al.* (2002) en BRCA1, extrapolables a BRCA2, suggereixen que les proteïnes BRCA

per sí mateixes no contribueixen a la transformació cel·lular, sinó que la pèrdua de BRCA1 i BRCA2 permetria a la cèl·lula superar el punt G2-M del cicle cel·lular i acumular dany al DNA. En les cèl·lules amb almenys una còpia intacta del gen, aquest dany podria ser reparat o conduir a l'apoptosi, però en cèl·lules sense BRCA1 o BRCA2 funcionals, es podrien **acumular mutacions** en diversos gens. Si aquests són essencials per la regulació del cicle cel·lular, com ara **p53**, es produiria un descontrol del cicle amb la conseqüent conversió de l'epiteli normal cap a un fenotip transformat (Lee *et al.*, 1999).

1.5.7 Paper dels estrògens en la funció BRCA i la progressió tumoral

Els individus portadors de mutacions germinals en els gens *BRCA1* i *BRCA2* presenten una alta probabilitat de desenvolupar càncer i, tot i que les proteïnes BRCA tenen funcions universals per totes les cèl·lules, l'increment més notable del risc es limita als carcinomes de **mama i ovari**, els dos principals **teixits diana dels estrògens** (Ford *et al.*, 1994; Johannsson *et al.*, 1999). L'expressió de BRCA1 i BRCA2 augmenta durant la pubertat i l'embaràs, quan les concentracions d'estrògens en sang són elevades (Gudas *et al.*, 1995; Marks *et al.*, 1997; Spillman i Bowcock, 1996).

Els estrògens són un conegut **factor promotor** del carcinoma de mama **esporàdic**, però la seva relació amb el càncer de mama hereditari és menys coneguda (revisat per Noruzinia *et al.*, 2005). Diversos estudis mostren l'existència d'interaccions entre les proteïnes BRCA i els estrògens. Com s'ha dit, els estrògens podrien activar l'expressió de BRCA1 a través de la inhibició de la proteïna Id4. A més, estudis de transfecció transitòria van mostrar que BRCA1 inhibia la resposta de l'ER α depenent de lligand (estrogen) i bloquejava la funció d'activació de la transcripció del receptor (Fan *et al.*, 1999). Aquests resultats suggereixen que BRCA1 suprimeix les vies transcripcionals dependents dels estrògens relacionades amb la proliferació de les cèl·lules de l'epiteli mamari i ovàric i que la pèrdua d'aquesta habilitat contribueix a la tumorigènesi.

Així, sembla que els estrògens podrien participar en la formació de tumors de mama i d'ovari en individus portadors d'un al·lel *BRCA* mutat. Com ja s'ha explicat en l'apartat anterior, la iniciació tumoral requereix la pèrdua del segon al·lel. D'acord amb el model de Knudson, el segon al·lel de *BRCA1* o *BRCA2* podria ser inactivat per processos genètics (com delecions i mutacions) o durant processos epigenètics (com la metilació de les regions promotores del gen) (vegeu apartat 3.1). En aquest sentit, els estrògens afavoreixen la **inactivació del segon al·lel** per dos mecanismes: d'una banda, augmenten la probabilitat d'aparició de mutacions degut a l'estimulació de la proliferació cel·lular (i per tant de la replicació i del dany al DNA en cèl·lules ER+) i per l'altra, els seus metabòlits genotòxics tenen un efecte mutagènic directe en el DNA. La combinació de l'acció promotora de la proliferació cel·lular deguda als estrògens i de la manca de reparació del DNA (causada per la pèrdua de *BRCA*), podria augmentar la freqüència de mutacions en diversos gens, que conduirien a la carcinogènesi en les cèl·lules de la mama i l'ovari (figura 9) (Noruzinia *et al.*, 2005).

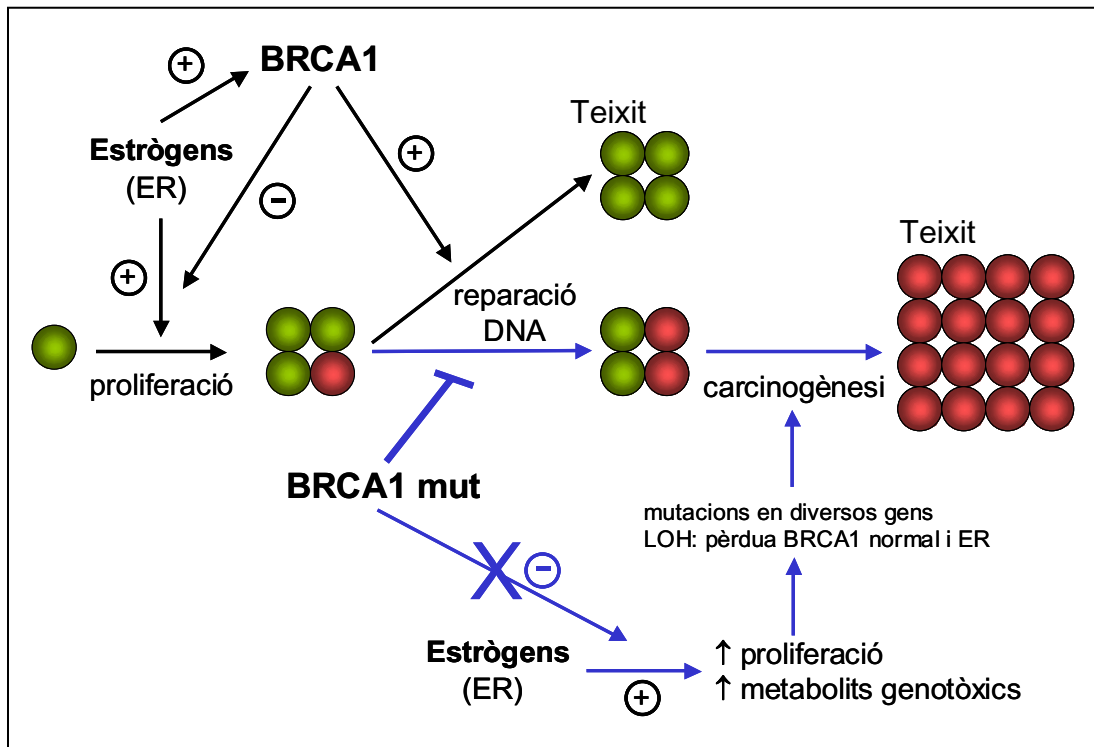


Figura 9 Model hipotètic sobre el paper de la inactivació de *BRCA1* en la carcinogènesi induïda per estrògens. Els estrògens estimulen la proliferació cel·lular a través del seu receptor (ER) i l'expressió de *BRCA1*. En algunes cèl·lules (en vermell), poden aparèixer lesions en el DNA degut a errors en la replicació. Amb *BRCA1* normal es frena la proliferació i s'estimula la reparació. En canvi, amb *BRCA1* mutat, segueixen apareixent lesions al DNA i no es pot frenar l'augment de la proliferació deguda als estrògens. A més, augmenten els metabolits genotòxics dels estrògens que causen més dany al DNA. Tot plegat condueix a l'aparició d'una inestabilitat genòmica i cromosòmica que provoca la formació del tumor.

2 MUTACIONS GERMINALS EN ELS GENS *BRCA1* I *BRCA2*

El banc de dades internacional Breast Cancer Information Core (BIC) recull la informació de centenars de mutacions detectades en els gens *BRCA1* i *BRCA2* (la majoria en famílies amb múltiples casos de càncer de mama o d'ovari), així com del tipus de pacient estudiat i la tecnologia utilitzada. Fins al moment, s'han identificat més de 1.500 variants diferents en *BRCA1* i gairebé 1.900 en *BRCA2*, incloent mutacions, polimorfismes i variants d'efecte biològic desconegut, el 60% de les quals s'han detectat només una vegada. En ambdós casos, les mutacions es troben distribuïdes al llarg de tota la seqüència del gen i no s'han observat "punts calents" en els que s'acumuli un major nombre de mutacions. Com s'explicarà en l'apartat 2.4, només algunes de les mutacions identificades en els gens *BRCA* apareixen de forma recurrent en determinades poblacions, degut principalment a l'existència d'efectes fundadors.

2.1 TIPUS DE MUTACIONS

La majoria de les **mutacions** descrites fins al moment són insercions o delecions d'**una o poques bases** que solen causar el desplaçament del marc de lectura (**frameshift**). També són freqüents les substitucions d'una sola base que causen l'aparició directa d'un codó de terminació (**nonsense**) i les que afecten els llocs d'**splicing**, les quals alteren la seqüència consens que els complexos de processament del pre-mRNA han de reconèixer per eliminar els introns. Les mutacions d'**splicing** poden causar la delecio parcial o completa (**exon skipping**) d'exons o la inserció de seqüències intròniques. A més de mutacions en la seqüència consens, variacions en regions exòniques poden alterar també la maduració del mRNA. L'efecte final d'aquests tipus de mutacions es preveu que sigui la síntesi d'una proteïna truncada i, per tant, una pèrdua de funció.

Les substitucions de bases poden provocar el canvi d'aminoàcids (mutacions **missense**) i conduir a l'alteració de l'estructura o la funció de la proteïna. El significat biològic de la majoria d'aquestes mutacions és, però, molt difícil d'avaluar i moltes d'elles es consideren **variants d'efecte biològic desconegut** (o variants no classificades). Com s'explicarà en l'apartat 2.6, hi ha diverses estratègies que poden ajudar a dilucidar el seu possible efecte patogènic.

Adicionalment, els gens *BRCA* presenten **grans reordenaments cromosòmics**, com insercions, delecions o duplicacions de més de 500 kb de DNA. Fins i tot, poden consistir en l'absència de tot el gen. La caracterització molecular d'aquestes mutacions mostra que la majoria dels grans reordenaments apareixen per recombinacions entre seqüències repetides de tipus *Alu*, elements molt freqüents sobretot en el gen *BRCA1*.

2.2 MÈTODES DE DETECCIÓ DE MUTACIONS

A causa de les grans dimensions del gens *BRCA* i al fet que les mutacions es reparteixin al llarg de tota la seqüència, la recerca de mutacions és un procés llarg i laboriós. Alguns dels **mètodes** més utilitzats pel cribratge de mutacions combinen l'anàlisi de la proteïna truncada (**PTT**, de *Protein Truncation Test*), l'anàlisi de conformacions de cadena senzilla (**SSCP**, de *Single Strand Conformation Polymorphism*) i la **seqüenciació** posterior dels fragments amb una mobilitat anòmala per tal d'identificar la mutació. En general, llevat de la seqüenciació, la sensibilitat dels mètodes citats varia entre el 60 i el 70% (Ford *et al.*, 1998). Altres mètodes, com ara l'electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant (**DGGE**, de *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) o la cromatografia líquida d'alta resolució (**HPLC**, de *High Performance Liquid Chromatography*) augmenten la sensibilitat considerablement, i per això són utilitzats de forma creixent en els laboratoris.

L'anàlisi dels gens *BRCA1* i *BRCA2* generalment es realitza a partir de mostres de DNA genòmic per la seva practicabilitat, tot i que també es pot utilitzar mRNA. En aquests casos cal tenir en compte l'existència d'un mecanisme cel·lular anomenat **nonsense-mediated mRNA decay (NMD)**, que degrada els mRNAs que contenen un

codó d'aturada prematura de la traducció. Aquest fenomen impedeix la detecció del producte (mRNA o proteïna) generat per l'al·lel mutat (Perrin-Vidoz *et al.*, 2002).

Per una altra banda, cap dels mètodes descrits no pot detectar **grans reordenaments** en heterozigosi i calen metodologies addicionals per detectar aquest tipus d'alteracions (revisat per Mazoyer *et al.*, 2005). Actualment es disposa d'una tècnica de quantificació genòmica basada en la hibridació de múltiples sondes específiques per cada exó del gen a estudiar (**MLPA**, de *Multiple-Ligand dependent Probe Amplification*) (Schouten *et al.*, 2002), que permet determinar simultàniament el nombre relatiu de còpies de tots els exons amb una elevada sensibilitat. Donada la seva practicabilitat, s'està incorporant ràpidament a l'algoritme d'anàlisi completa dels gens *BRCA*.

2.3 FREQUÈNCIA DE MUTACIONS

L'anàlisi molecular dels gens *BRCA1* i *BRCA2* en diferents poblacions mostra un ampli espectre de mutacions i una prevalença mutacional molt variable depenent dels criteris de selecció de les famílies o pacients, del seu origen ètnic i dels mètodes de detecció utilitzats.

Població general

Les freqüències dels al·lells de *BRCA* mutats en la **població general** (excloent població jueva asquenasa i islandesa), no s'han calculat directament, però s'han obtingut estimacions que varien entre el **0,05%** i el **0,26%** per *BRCA1*, i el **0,08%** i el **0,34%** en el cas de *BRCA2* (Ford i Easton, 1995; Peto *et al.*, 1999; Antoniou *et al.*, 2000). En països o grups ètnics amb mutacions fundadores altament prevalents, aquests percentatges són significativament més elevats. Per exemple, en població **jueva asquenasa** s'ha estimat que un **2,5%** dels individus presenten una de les tres mutacions fundadores identificades en els gens *BRCA* (Struewing *et al.*, 1995; Oddoux *et al.*, 1996; Hartge *et al.*, 1999). A **Islàndia**, es calcula que el **0,6%** dels individus són portadors d'una mutació fundadora en *BRCA2* (Thorlacius *et al.*, 1996).

Individus afectes no seleccionats per la història familiar

En estudis poblacionals, en els que s'inclouen dones amb càncer de mama o ovari no seleccionades segons els antecedents familiars, normalment s'analitzen dones diagnosticades a una edat precoç, ja que són les més susceptibles de presentar una mutació en *BRCA1* o *BRCA2*. A la taula 4 es resumeixen les freqüències de mutacions en els gens *BRCA* obtingudes en estudis poblacionals fets en dones no jueves amb càncer de mama.

Taula 4 *Freqüència de les mutacions en els gens BRCA1 i BRCA2 en dones amb càncer de mama no seleccionades per la història familiar.*

Referència	País	Nº de pacients	Edats estudiades	BRCA1 %	BRCA2 %	Total %
Europa						
Thorlacius <i>et al.</i> (1997)*	Islàndia	632	Totes	-	7,7	-
Garcia-Patiño <i>et al.</i> (1998)*	Espanya	105	Totes	5,7	-	-
De Sanjosé <i>et al.</i> (2003)	Espanya	136	< 46	0,7	5,9	6,6
Martínez-Ferrandis <i>et al.</i> (2003)	Espanya	124	< 41	0,8	4,8	5,6
Bonadona <i>et al.</i> (2005)	França	232	< 46	6,5	2,6	9,1
Peto <i>et al.</i> (1999)	Gran Bretanya	254	< 36	3,5	2,4	5,9
Anglian BCSG (2000)	Gran Bretanya	1.435	< 55	0,7	1,3	2,0
Van Der Looij <i>et al.</i> (2000a)	Hongria	500	Totes	3,4	0,2	3,6
Papelard <i>et al.</i> (2000)*	Holanda	642	27 – 91	1,6	-	-
Syrjakoski <i>et al.</i> (2000)	Finlàndia	1.035	Totes	0,4	1,5	1,8
Loman <i>et al.</i> (2001)	Suècia	234	< 41	6,8	2,1	9,0
Amèrica del Nord						
Malone <i>et al.</i> (2000)	Estats Units	203	< 35	5,9	3,4	9,4
Tonin <i>et al.</i> (2001)	Canadà	61	< 40	6,6	6,6	13,2
Austràlia						
Hopper <i>et al.</i> (1999)	Austràlia	388	< 40	2,3	2,3	4,6
Àsia						
Katagiri <i>et al.</i> (1996)*	Japó	103	< 35	3,9	-	-
Emi <i>et al.</i> (1998)*	Japó	1.000	Totes	0,8	-	-
*Estudis en els quals només s'ha analitzat un dels dos gens BRCA1 De León-Matsuda <i>et al.</i> (2002)	Índia	294	25 – 64	1,0	4,1	5,1
Liede <i>et al.</i> (2002)	Paquistàn	341	Totes	4,4	2,3	6,7

L'estudi poblacional més ampli fins ara publicat (Anglian Breast Cancer Study Group, 2000), fet en 1.435 dones britàniques amb càncer de mama diagnosticat abans dels **55 anys**, va trobar unes freqüències del **0,7%** per *BRCA1* i de l'**1,3%**, per *BRCA2*. Els autors van estimar també les freqüències en tres grups classificats segons l'edat al diagnòstic (<35 anys, 35-44 anys i 45-54 anys) i, com era previsible, els valors augmentaven a mida que disminuïa l'edat al diagnòstic. De forma rellevant, les dones diagnosticades abans dels **35 anys** presentaven una prevalença significativament més elevada de mutacions en *BRCA2* (**8,3%**) respecte *BRCA1* (**4,1%**).

En dones **jueves asquenasites**, dos estudis fets en dones amb càncer de mama diagnosticat abans dels **40 anys** mostren que aproximadament el **20%** presenta una mutació en *BRCA1* o *BRCA2* (Neuhausen *et al.*, 1996; Offit *et al.*, 1996).

Famílies amb càncer de mama i ovari hereditari

En famílies amb CMOH la prevalença de mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* en general és més elevada en aquelles famílies amb tres o més casos (alt risc) que en famílies amb només dos casos (risc moderat) (taula 5). Addicionalment, la presència d'algun cas de càncer d'ovari o d'un home amb càncer de mama es relaciona amb un augment de la freqüència de mutacions. D'altra banda, el percentatge de mutacions pot variar en funció de la capacitat de detecció de la metodologia utilitzada en cada estudi.

Taula 5 Freqüència de les mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* en famílies amb CMOH.

Referències	País/ Població	Mètodes de detecció	Famílies Risc	n	<i>BRCA1</i> %	<i>BRCA2</i> %	Total %
Europa							
Kiechle <i>et al.</i> (2000)	Alemanya	DHPLC	↑↑	110	37,3	10,0	47,3
Meindl <i>et al.</i> (2002)	Alemanya	DHPLC, PTT, SD, SSCP	Total*	989	21,3	9,1	30,4
Meyer <i>et al.</i> (2003)	Alemanya	DHPLC	Total*	188	16,0	10,1	26,1
Claes <i>et al.</i> (2004)	Bèlgica	DGGE, HA, MLPA, PTT	Total	291	15,8	8,6	24,4
			↑↑	91	26,4	13,2	39,6
			↑	200	11,0	6,5	17,5
Fricker <i>et al.</i> (2000)	França	PTT, SD	Total*	37	37,8	-	-
Ladopoulou <i>et al.</i> (2002)	Grècia	PTT, SSCP	↑↑	37	16,2	5,4	21,6
Santarosa <i>et al.</i> (1999)	Itàlia	PTT, SSCP	Total*	57	15,8	21,0	36,8
Ottini <i>et al.</i> (2000)	Itàlia	PTT, SSCP	↑	55	5,5	5,5	11,0
Stuppia <i>et al.</i> (2003)	Itàlia	PTT, SSCP	↑	68	7,3	4,4	11,7
Gorski <i>et al.</i> (2004)	Polònia	SD	↑↑	200	61,0	3,5	64,5
Manguoglu <i>et al.</i> (2003)	Turquia	DGGE, PTT	↑	23	8,7	4,3	13,0
Altres							
Gao <i>et al.</i> (2000)	Afroamericana	HA, PTT, SSCP	↑	28	3,6	14,3	17,9
Mann <i>et al.</i> (2006)	Austràlia	DHPLC	↑↑	747	16,3	14,3	30,6
Reeves <i>et al.</i> (2004)	Sud Àfrica	HA/SSCP, PTT	↑↑	90	20	-	-

Risc: ↑↑ : alt (≥ 3 casos CM/CO o CM en home) ; ↑ : moderat (2 casos CM/CO).

Total* : no s'especificuen les mutacions trobades en els diferents grups de risc.

SD : seqüenciació directa

En les famílies d'**alt risc**, la majoria d'estudis mostren freqüències de mutacions entre aproximadament el **20** i el **40%**, encara que en poblacions amb efectes fundadors com la polonesa s'assoleixen valors de fins el 64,5% (Gorski *et al.*, 2004). En canvi, la proporció de famílies de **risc moderat** amb mutació es troba aproximadament entre el **10** i el **20%** en les diferents sèries.

Pel que fa als **grans reordenaments**, la seva proporció respecte el total de mutacions identificades en famílies amb CMOH varia segons les poblacions. En *BRCA1*, a França i Alemanya la proporció és relativament baixa, del **9,5** i **8%** respectivament (Gad *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2004), mentre que en altres poblacions representen un percentatge més elevat: **27%** a **Holanda** (Hogervorst *et al.*, 2003) i **40%** en una petita sèrie a **Itàlia** (Montagna *et al.*, 2003). En *BRCA2* no hi ha tants estudis publicats, però sembla que els grans reordenaments expliquen un

menor nombre de famílies que en *BRCA1*. Per exemple, a **França**, Tournier *et al.* (2004) van estimar que el **10%** de les mutacions identificades en el gen *BRCA2* eren grans reordenaments i a **Itàlia**, Agata *et al.* (2005) descriuen una proporció similar (**11%**).

2.4 MUTACIONS RECURRENTS

Tot i que la majoria de mutacions *BRCA* s'han trobat en una única família, algunes són recurrents en individus d'ètnies o poblacions geogràficament definides, degut a **efectes fundadors**. Aquestes mutacions apareixen en un grup relativament petit d'ancestres o "fundadors" i, amb l'expansió de la població en generacions successives, l'endogàmia i l'aïllament, es poden convertir en alteracions altament recurrents. A més, existeixen mutacions presents en més d'una família que provenen d'**esdeveniments mutacionals independents**. En la taula 6 es mostren algunes de les mutacions fundadores més prevalents.

Taula 6 Exemples de mutacions fundadores en *BRCA1* i *BRCA2*. Tret de Nagy *et al.*, 2004.

Població	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	Referències
Afroamericana	M1775R, 1832del5, 5296del4		Gao <i>et al.</i> (1997)
Anglesa	4184del4	2157delG	Evans <i>et al.</i> (2004)
Escocesa	2800delAA		Liede <i>et al.</i> (2000)
Francocanadenca	C4446T	8765delAG	Simard <i>et al.</i> (1994), Tonin <i>et al.</i> (1999)
Holandesa	2904delAA, del510, del3835	5573insA	Peelen <i>et al.</i> (1997); Petrij-Bosch <i>et al.</i> (1997)
Islandesa		999del5	Thorlacius <i>et al.</i> (1996)
Jueva asquenasita	185delAG, 5382insC	6174delT	Struewing <i>et al.</i> (1995), Neuhausen <i>et al.</i> (1996), Tonin <i>et al.</i> (1996)
Noruega	1675delA, 1135insA		Andersen <i>et al.</i> (1996)
Polonesa	5382insC, C61G, 4153delA		Gorski <i>et al.</i> (2000)
Russa	5382insC, 4153delA		Gayther <i>et al.</i> (1997a)
Sueca	Q563X, 3166ins5, 1201del1, 2594delC	4486delG	Johannsson <i>et al.</i> (1996), Håkansson <i>et al.</i> (1997)

En **població jueva asquenasita**, per exemple, s'han identificat dues mutacions fundadores en *BRCA1* (185delAG i 5382insC) i una en *BRCA2* (6174delT) (Struewing *et al.*, 1995; Neuhausen *et al.*, 1996; Tonin *et al.*, 1996). S'ha calculat que aproximadament un **2,5%** dels individus de la població general i un **59%** de les famílies d'alt risc són portadors d'una d'aquestes tres mutacions (Levy-Lahad *et al.*, 1997). Encara que la majoria de les famílies portadores de la mutació ***BRCA1* 185delAG** són asquenasites, també s'ha identificat en altres grups jueus (Bar-Sade *et al.*, 1998). La presència de la mutació en famílies espanyoles associada al mateix haplotip que el present a jueus asquenasites (Díez *et al.*, 1999) suggereix un origen antic i comú de la mutació en població jueva, tant sefardita (espanyola) com asquenasita. A més, aquesta mutació està associada a un haplotip diferent en individus no jueus, en tres famílies de Gran Bretanya (Xu *et al.*, 1997), fet que

implica dos o més esdeveniments mutacionals independents en aquesta posició. D'altra banda, la mutació **BRCA2 6174delT**, que no apareix en població espanyola, sembla restringida als jueus asquenases, indicant un origen més recent que el de 185delAG. La mutació **BRCA1 5386insC** sembla ser d'origen bàltic i és comuna a Polònia, Rússia i altres parts de l'Europa de l'est. Si bé apareix en la majoria de poblacions europees, fins al moment no s'ha identificat en l'espanyola.

Una deleció en l'exó 9 de **BRCA2, 999del5**, és excepcionalment freqüent a **Islàndia**. És present en el **0,6%** dels islandesos i es relaciona fins amb un **40%** dels casos de càncer de mama en **homes** d'aquesta població (Thorlacius *et al.*, 1996). A **Finlàndia**, aquesta mutació és la més comuna de les catorze mutacions recurrents identificades en els gens *BRCA*. La presenten el 17% de totes les famílies *BRCA1/BRCA2* i un terç de les famílies *BRCA2* (Sarantaus *et al.*, 2000). Els resultats obtinguts de l'estudi dels haplotips en famílies islandeses i finlandeses portadores semblen indicar un origen ancestral comú a Islàndia i a Finlàndia, encara que no es poden descartar diversos esdeveniments mutacionals (Barkardottir *et al.*, 2001).

Diversos estudis realitzats en **població espanyola** indiquen que no hi ha mutacions recurrents amb una elevada prevalença en el conjunt de la població, però s'han trobat mutacions amb una freqüència augmentada en diverses regions del país (Osorio *et al.*, 1998; Llorca *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2002).

Pel que fa als **grans reordenaments**, l'any 1999 es va identificar una **duplicació de l'exó 13 de BRCA1** en quatre famílies no relacionades que presentaven un haplotip comú (Puget *et al.*, 1999). Un estudi multicèntric posterior va trobar la mutació en un elevat nombre de famílies en diversos països (The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group, 2000) i l'anàlisi de l'haplotip va indicar un probable origen a la **Gran Bretanya**. No es va identificar en cap família espanyola estudiada.

Altres exemples de mutacions fundadores que consisteixen en grans reordenaments són dues deleccions genòmiques originàries d'**Holanda** en el gen **BRCA1**, localitzades en els introns 12 i 21 i consistents en la deleció de 3835 (**del3835**) i 510 (**del510**) bases, respectivament (Petrij-Bosch *et al.*, 1997). Les dues s'identifiquen en un elevat percentatge de les famílies amb CMOH d'aquest país.

2.5 PENETRÀNCIA I EXPRESSIVITAT

La **penetrància** equival a la probabilitat (risc) amb la que un portador d'una mutació desenvolupa una malaltia, i normalment es defineix en termes d'una edat donada (per exemple, als 70 anys). És ben conegut que les mutacions heretades en els gens *BRCA1* i *BRCA2* incrementen notablement el risc de desenvolupar càncer de mama i ovari. No obstant, la magnitud exacta d'aquest risc, és a dir, la penetrància d'aquestes mutacions, continua essent objecte de controvèrsia, donat l'elevat nombre de factors modificadors del risc que existeixen (revisat per Narod, 2002) (vegeu apartat 4.2.).

El càncer de mama és la malaltia més comuna en les dones, amb un risc al llarg de la vida de més del **10%**. El càncer d'ovari és més rar, amb un risc de només l'**1,8%** al llarg de la vida, però és un dels càncers més letals que existeixen (King *et al.*, 2003). Atès que els individus amb dos al·lels *BRCA* no mutats presenten un cert risc de patir càncer (càncer esporàdic), les estimacions de penetrància realitzades en grups d'individus susceptibles, comprenen el risc atribuïble a l'al·lel de susceptibilitat i el risc poblacional.

D'altra banda, les mutacions *BRCA* tenen una **expressivitat** variable i s'han descrit riscos augmentats de desenvolupar altres càncers a part del de mama i ovari, sobretot en portadors de mutacions en *BRCA2*.

2.5.1 Risc de càncer de mama i ovari

Els primers estudis sobre els riscos de càncer de mama i d'ovari associats a mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* es van realitzar en famílies amb molts casos, fet que va afavorir l'obtenció de valors de risc extremadament elevats. El risc de càncer de mama als 70 anys es calculava al voltant del 84% i del 87% en portadores *BRCA1* i *BRCA2*, respectivament, mentre que pel càncer d'ovari aquests riscos eren del 67% i el 27% (Ford *et al.*, 1998). Estudis fets en poblacions menys seleccionades van obtenir estimacions de risc inferiors al 60% pel càncer de mama i al 30% pel càncer d'ovari al llarg de la vida (Serova *et al.*, 1997; Struewing *et al.*, 1997). No obstant, en un treball recent del New York Breast Cancer Study Group (King *et al.*, 2003), es van seleccionar 1.008 casos índex de càncer de mama d'entre una població de dones jueves asquenases. La selecció es va fer independentment de si hi havia una història familiar de càncer i es va realitzar una anàlisi genètica de tots els membres de les famílies de les 104 dones en les que s'identificà una mutació. Les dades mostren que les portadores de mutacions en *BRCA1* o *BRCA2* tenien un **82%** de risc de desenvolupar càncer de **mama fins als 80 anys** d'edat, mentre que pel càncer d'**ovari** el risc era del **54%** per *BRCA1* i del **23%** per *BRCA2*.

A més, s'ha calculat que les dones amb càncer de **mama i mutació** en *BRCA1* o *BRCA2* tenen unes **10 vegades** més probabilitats de patir un càncer d'**ovari** [Frank *et al.*, 1998; Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), 1999] i un risc d'entre el **12%** i el **20%** de desenvolupar un **segon càncer de mama** durant els cinc anys després del diagnòstic del primer (Verhoog *et al.*, 1998 i 1999).

2.5.2 Risc de càncer de mama en homes

Pocs estudis han examinat el risc acumulat de càncer de mama en homes portadors de mutacions en *BRCA2*. Easton *et al.* (1997) van estudiar dues grans famílies lligades a *BRCA2* per estimar la penetrància de les mutacions en aquest gen. Els autors van estimar un risc acumulat del **6,3%** als **70 anys**. Recentment, Thompson i Easton (2001) van examinar 134 famílies amb CMOH i van trobar que els homes portadors de mutacions en *BRCA2* tenien gairebé un **7%** de risc acumulat de patir

càncer de mama als **80 anys**, unes 80 vegades més elevat que el de la població general. Els resultats de diversos estudis fets en homes amb càncer de mama no seleccionats per història familiar suggereixen que les mutacions en *BRCA2* s'associen a un **11%** dels casos (Thompson i Easton, 2004).

D'altra banda, diversos estudis demostren que l'associació de ***BRCA1*** amb el càncer de mama masculí és considerablement més **feble**. La majoria d'estudis fets en homes amb càncer de mama no han identificat cap mutació en *BRCA1* (Stratton *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1997; Csokay *et al.*, 1999). Altres, però, indiquen l'existència d'una certa associació. Per exemple, Ottini *et al.* (2003) van observar que el 4% dels casos de càncer de mama en homes de Florència (Itàlia) presentaven mutació en *BRCA1*. En homes jueus asquenassites, es va identificar una mutació *BRCA1* en el 3,6% (Struewing *et al.*, 1999), i un estudi de Frank *et al.* (2002) va trobar que el 10,5% dels homes jueus amb càncer de mama presentaven mutacions en aquest gen. El nombre reduït de famílies amb homes amb càncer de mama i mutació en *BRCA1*, però, fa que sigui difícil estimar la penetrància d'aquestes mutacions.

2.5.3 Risc d'altres càncers associats a *BRCA1* i *BRCA2*

Tot i que hi ha pocs estudis sobre els riscs de desenvolupar altres neoplàsies a més de mama i d'ovari, els riscs augmentats en portadors de mutació en *BRCA2* semblen ser més pronunciats que en portadors de *BRCA1* (BCLC, 1999; Brose *et al.*, 2002). En un estudi basat en 173 famílies amb mutació en ***BRCA2*** es va trobar un augment estadísticament significatiu de càncer de pròstata (RR 4,65), pàncrees (3,51), vesícula i vies biliars (4,47), estómac (2,59) i melanoma maligne (2,58) (BCLC, 1999). A diferència de l'estudi anterior, basat principalment en famílies amb molts casos de càncer de mama i ovari, Van Asperen *et al.* (2005) van examinar els riscs d'altres càncers en 139 famílies menys seleccionades. Els autors suggereixen que els portadors tenen un risc augmentat de patir càncer de **pàncrees** (RR **5,9**) i **pròstata** (**2,5**) i probablement d'**ossos** i **faringe**. Gairebé tots els augments van ser significatius només en homes.

En un estudi fet en 699 famílies, s'observà que les dones portadores de mutació en ***BRCA1*** tenien gairebé el **doblet** de risc de patir neoplàsies diferents de càncer de mama i ovari, com càncer d'**endometri**, **cèrvix**, **trompa de Fal·lopi** i **peritoneu** (Thompson i Easton, 2002b). Es va observar també un augment de risc de càncer de pàncrees en ambdós sexes i de pròstata abans dels 65 anys. En un estudi paral·lel fet en 483 portadors de mutació en *BRCA1* de 147 famílies amb càncer de mama i ovari, es va trobar un risc augmentat de càncer de **còlon** (doblet), **pàncrees** (triple), **estómac** (quàdruple) i **trompa de Fal·lopi** (120 vegades) en portadors de mutacions en *BRCA1* comparat amb població control (Brose *et al.*, 2002).

2.5.4 *BRCA2 i l'anèmia de Fanconi*

L'Anèmia de Fanconi és una malaltia autosòmica recessiva caracteritzada per disfunció de la medul·la òssia, malformacions congènites i una elevada predisposició al càncer. Les cèl·lules dels pacients són hipersensibles a agents inductors d'enllaços creuats en el DNA i, després del tractament amb aquests agents, presenten inestabilitat cromosòmica i altres anomalies citogenètiques. La malaltia es produeix com a conseqüència de l'alteració d'algun dels múltiples gens de la família **FANC**. Arran de la identificació del gen **FANCD1** com el mateix gen **BRCA2**, s'han trobat individus amb anèmia de Fanconi portadors de dues mutacions en heterozigosi en **BRCA2**. En alguns casos, les famílies presenten síndromes associades a tumors de **mama i cervell** (Offit *et al.*, 2003) o a tumors de **mama i leucèmia precoç** (Wagner *et al.*, 2004).

2.5.5 *Correlació genotip – fenotip: localització de mutacions*

Tal i com hem vist, l'expressivitat dels gens **BRCA** és variable i no tots els portadors desenvolupen càncer de mama o d'ovari amb la mateixa freqüència. En aquest sentit, hi ha poques dades sobre els efectes específics d'una mutació determinada. Tant per **BRCA1** com **BRCA2**, però, s'han suggerit diverses correlacions entre genotip i fenotip basades en la **localització** de les mutacions i la **proporció de casos de càncer d'ovari** respecte els de **mama** en les famílies.

En **BRCA1**, la primera evidència formal d'una correlació genotip - fenotip prové d'un estudi de 33 famílies on es va identificar una proporció de càncer d'ovari : càncer de mama significativament inferior en famílies amb mutacions a 3' de l'exó 12 del gen (Gayther *et al.*, 1995). Un altre estudi, realitzat en 134 pacients amb mutacions truncants en **BRCA1** (Holt *et al.*, 1996), va trobar una proporció de càncer d'ovari era significativament inferior per mutacions situades a 3' del domini granina (codons 1214-1223). Així doncs, el **càncer d'ovari** apareix amb més freqüència associat a mutacions de la **meitat 5'** de **BRCA1**. En un estudi més recent, que incloïa 356 famílies amb mutació en **BRCA1** (Thompson i Easton, 2002c), es va situar el punt de tall per diferenciar els riscos de càncer de mama i d'ovari en el nucleòtid 4191 (codó 1358), entre les dues estimacions anteriors. A més, els autors van definir una regió central del gen (nucleòtids 2401-4190) amb una proporció de càncer d'ovari : càncer de mama significativament superior a la resta, mentre que les regions 5' i 3' presentaven valors semblants (Figura 10A). Van observar que l'efecte més gran en aquesta regió era una reducció del 29% del risc de càncer de mama comparat amb mutacions en les altres dues regions, mentre que l'augment en el risc de càncer d'ovari va resultar no ser significatiu.

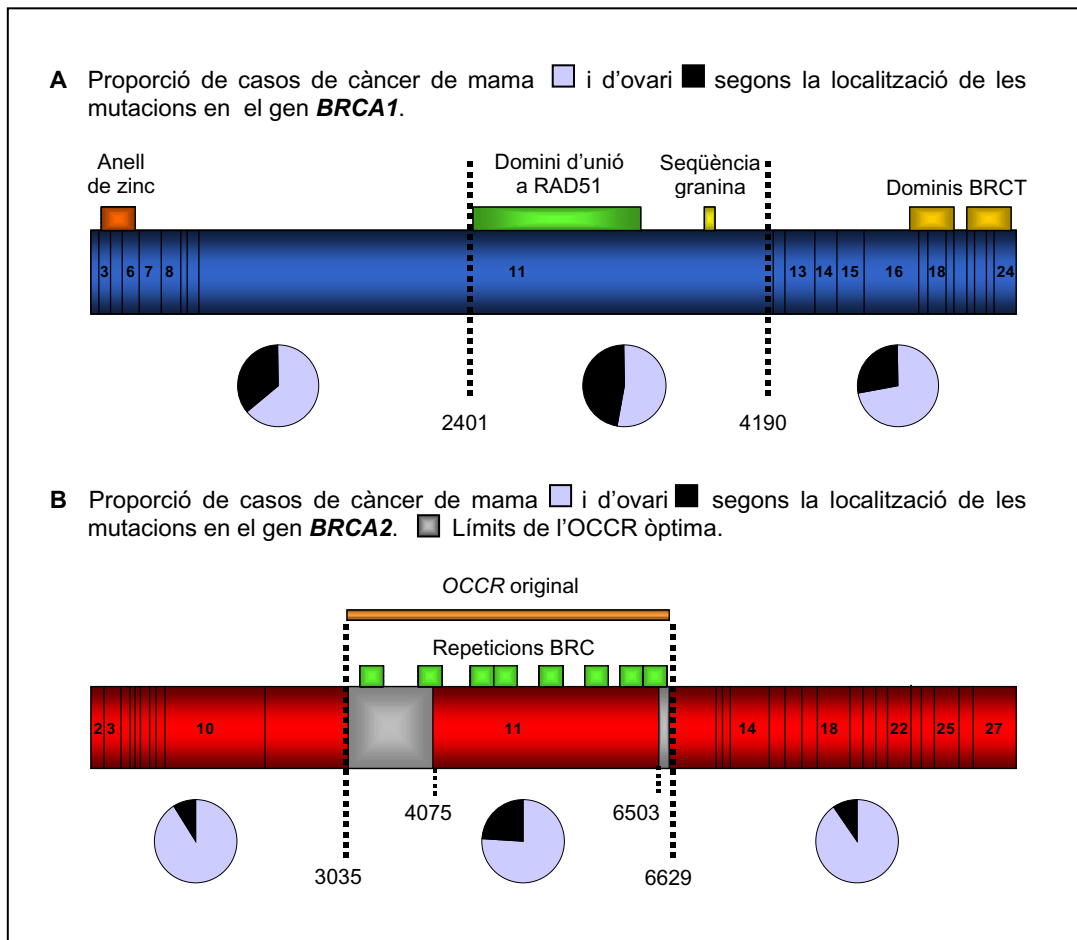


Figura 10 Possibles correlacions genotip - fenotip descrites en els gens *BRCA*. La localització de les mutacions en *BRCA1* (A) o *BRCA2* (B) podria influir en el risc de desenvolupar càncer de mama o d'ovari.

En *BRCA2*, Gayther *et al.* (1997b) van proposar l'existència d'una regió associada a un major risc de **càncer d'ovari** anomenada **ovarian cancer cluster region** (OCCR), situada al mig de l'exó 11 (entre els nucleòtids 3035 i 6629) (figura 10B). En un estudi posterior (Thompson i Easton, 2001), fet en 164 famílies, es va redefinir aquesta regió, els límits de la qual oscil·larien entre els nucleòtids 3059-4075 i 6503-6629 (figura 10B, en gris). Els resultats de l'anàlisi estadística van indicar que, atenent a la localització de les mutacions, la proporció càncer d'ovari : càncer de mama en la regió OCCR era superior a l'observada en altres regions del gen. En l'OCCR hi hauria una reducció del risc de càncer de mama respecte mutacions fora d'aquesta regió, i no un augment del risc de càncer d'ovari. En aquest mateix estudi la incidència de **càncer de mama en homes** no semblava correlacionar amb cap localització particular de les mutacions, però es va trobar una lleugera disminució del risc de càncer de **pròstata** en els pacients amb mutació dins l'OCCR.

2.6 VARIANTS D'EFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT

Les alteracions genètiques que causen la síntesi d'una proteïna truncada o anòmala es consideren directament patogèniques i, exceptuant alguns casos (Mazoyer *et al.*, 1996), es classifiquen com a predisposants. En canvi, el risc associat a les variants de canvi d'aminoàcid costa molt més d'avaluar, i és difícil classificar-les com a mutacions associades a la malaltia o com a polimorfismes benignes. El problema d'aquestes variants no classificades, que poden incloure també insercions o delecions de triplets sense trencar el marc de lectura i canvis en regions intròniques (i de vegades exòniques) que podrien afectar el procés d'*splicing*, representa un gran obstacle pel consell genètic.

Diversos tipus d'evidències poden ajudar a classificar aquestes variants com a deletèries/d'alt risc o neutres/de baix risc, respecte a la malaltia d'interès. Cada una d'aquestes fonts d'evidència presenta avantatges i limitacions pròpies a l'hora d'avaluar l'efecte biològic de les variants no classificades (Goldgar *et al.*, 2004).

Algunes de les estratègies utilitzades es resumeixen a continuació:

1 Consulta de publicacions i bases de dades internacionals

La base de dades més gran sobre mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* (BIC) i les fonts bibliogràfiques, poden aportar-nos informació sobre la variant que es vol estudiar o sobre canvis similars en la regió del gen on es localitza.

2 Freqüència en casos i controls

La presència d'una variant en individus d'alt risc i la seva absència en individus controls és un indicatiu de la seva patogenicitat. En general, es considera que les variants que presenten una incidència de $\geq 1\%$ en població control són polimorfismes. Ara bé, la majoria de variants són molt poc freqüents i de vegades presenten especificitat ètnica, fets que dificulten l'obtenció de conclusions en estudis poblacionals.

3 Anàlisi de cosegregació familiar amb la malaltia

La cosegregació de la variant amb el càncer dins d'una família és un bon indicatiu del seu caràcter predisponent a la malaltia. Recentment, Thompson *et al.* (2003) han descrit un model estadístic que avalua la magnitud d'aquesta causalitat.

4 Coocurrència (en trans) amb mutacions deletèries conegudes

Diversos estudis mostren que la disrupció homozigota de *Brca1* en ratolí és letal per l'embrió (revisat per Brodie i Deng, 2001). A més, en individus amb les mutacions fundadores *BRCA1* 185delAG i *BRCA1* 5382insC, el nombre d'homozigots i heterozigots compostos de mutacions patogèniques és menor que l'esperat (Frank *et al.*, 2002; Abkevich *et al.*, 2004). Aquestes observacions indiquen que si una variant es presenta amb una mutació deletèria coneguda en el mateix individu, és poc probable que confereixi un elevat risc de càncer. En *BRCA2*, tot i que s'han trobat heterozigots compostos entre els individus amb anèmia de Fanconi tipus D1, s'assumeix que és extremadament rar trobar adults

heterozigots amb dues mutacions deletèries en *BRCA2*, ja que normalment el fenotip d'anèmia de Fanconi condueix a la mort en la infantesa. Goldgar *et al.* (2004) han descrit una aproximació estadística que permet avaluar la causalitat en aquests casos.

5 Anàlisi de les substitucions aminoacídiques: posició, naturalesa i grau de conservació de l'aminoàcid entre espècies

El fet que una variant *missense* es localitzi en un domini funcional conegut de *BRCA1* o *BRCA2*, fa que aquesta tingui més probabilitats de predisposar al càncer que una altra que es trobi fora d'aquestes regions. En *BRCA1*, els dos dominis funcionals més ben caracteritzats són el domini en dit de zinc (residus 14-64) i els dominis BRCT (residus 1642-1863). En *BRCA2*, ho són el domini d'activació transcripcional (residus 23-105), les 8 repeticions BRC a l'exó 11 (residus 638-2280) i el domini d'unió al DNA (residus 2478-3185).

D'altra banda, l'efecte de la substitució d'un aminoàcid per un altre amb propietats molt diferents s'espera que sigui més important que els canvis entre aminoàcids de característiques semblants. Algunes de les propietats estudiades són la composició química, la càrrega, la polaritat i el volum dels l'aminoàcids (Abkevich *et al.*, 2004; Mirkovic *et al.*, 2004).

Pel què fa a l'anàlisi de la variació de seqüència interespecífica, Miller i Kumar (2001) van validar la hipòtesi que variants *missense* situades en residus altament conservats serien amb més probabilitat deletèries, mentre que canvis en residus molt variables serien probablement neutres. En el cas de *BRCA1*, s'ha utilitzat l'alineament de seqüències de proteïnes homòlogues de diverses espècies de mamífers i altres animals (Fleming *et al.*, 2003; Abkevich *et al.*, 2004) per tal de determinar quins són els residus més conservats i poder fer classificacions preliminars de suposades mutacions *missense*.

Dos exemples de mutacions *missense* clarament patogèniques en *BRCA1* són Cys61Gly i Cys64Gly. Els resultats publicats per Wu *et al.* (1996) mostren que aquestes dues substitucions, situades dins l'anell de zinc de la proteïna *BRCA1*, estan altament conservats durant l'evolució i tenen efectes biològics demostrables, com la interrupció de la interacció *BRCA1*-*BARD1*.

6 Estudis funcionals

En els últims anys s'han posat a punt diversos estudis funcionals que mesuren la influència de variants genètiques en l'activitat salvatge de *BRCA1* i *BRCA2*, en moltes ocasions per dominis concrets de la proteïna:

- *Activitat ubiquitina (BRCA1)*: la proteïna *BARD1* s'uneix al domini en anell en dit de zinc de l'extrem N-terminal de *BRCA1*. El complex *BRCA1*-*BARD1* actua com a E3 ubiquitina ligasa (Baer i Ludwig, 2002) i s'ha comprovat que mutacions *missense* associades a càncer en aquesta regió poden afectar l'activitat ubiquitina *in vitro* (Brzovic *et al.*, 1998 i 2001; Ruffner *et al.*, 2001).

- *Activació transcripcional (BRCA1)*: els dominis BRCT de la regió C-terminal de BRCA1 presenten una funció d'activació de la transcripció quan es fusionen a un domini d'unió al DNA heteròleg (Chapman i Verma, 1996; Monteiro *et al.*, 1996) i mitjancen la interacció de BRCA1 amb l'holoenzim de la RNA polimerasa II (Scully *et al.*, 1997b). Diversos estudis mostren que mutacions *missense* localitzades en aquesta regió aboleixen l'activitat transcripcional en sistemes artificials (Chapman i Verma, 1996; Monteiro *et al.*, 1997; Monteiro i Humphrey, 1998; Hayes *et al.*, 2000; Vallon-Christersson *et al.*, 2001; Phelan *et al.*, 2005).
- *Supervivència i viabilitat cel·lular (BRCA2)*: en un estudi recent (Wu *et al.*, 2005), es mesura la funció BRCA2 de reparació del dany al DNA i manteniment de la integritat cromosòmica mitjançant assaigs *in vitro* que avaluen la localització subcel·lular de BRCA2, la sensibilitat a mitomicina C (agent intercalant), la reparació del DNA per recombinació homòloga i l'amplificació centrosòmica en línies cel·lulars amb un *BRCA2* normal i en portadores de variants no classificades, per establir-ne la seva patogenicitat

7 Estudis de pèrdua al·lèlica en tumors de portadors

La pèrdua al·lèlica o pèrdua d'heterozigositat (LOH, de *loss of heterozygosity*) és un mecanisme habitual d'inactivació de l'al·lel salvatge de *BRCA* en portadors d'una mutació germinal (vegeu apartat 3.2). La seva observació associada a una variant d'efecte desconegut, pot indicar el seu caràcter patogènic.

8 Estudis de RNA: efectes en l'*splicing*

L'alteració de les seqüències que intervenen en el procés d'*splicing* pot afectar greument la transcripció i generar mRNAs anormals. Aquest fenomen es observa mitjançant l'estudi de l'RNA del portador.

3 PATOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI

3.1 MECANISMES D'INACTIVACIÓ AL·LÈLICA DE *BRCA1* I *BRCA2*

3.1.1 Hipòtesi dels "two hits" de Knudson

El model carcinogènic de Knudson es basa en que és necessària la inactivació dels dos al·lells d'un gen supressor de tumors perquè es produeixi una pèrdua total d'activitat i la progressió tumoral (Knudson, 1997). En el model, els "two hits" (o dos esdeveniments mutagènics) que condueixen a la inactivació al·lèlica es produeixen mitjançant dos mecanismes: les **mutacions** intragèniques i la pèrdua de material cromosòmic (**LOH**).

L'alta freqüència de LOH en els *loci* de *BRCA1* i *BRCA2* en els tumors de mama i d'ovari, tant hereditaris com esporàdics, van conduir a la hipòtesi que atribueix una activitat supressora de tumors als dos gens, basada en el model de Knudson. Ara

bé, el fet que s'hagin identificat molt poques mutacions somàtiques en els gens *BRCA* en tumors esporàdics ho feia posar en dubte. En aquest sentit, recentment s'han descrit dos mecanismes d'inactivació al·lèlica alternatius a les mutacions somàtiques: el procés epigenètic d'**hipermetilació del promotor** en *BRCA1* i la unió de la proteïna repressora **EMSY**, en *BRCA2* (figura 11).

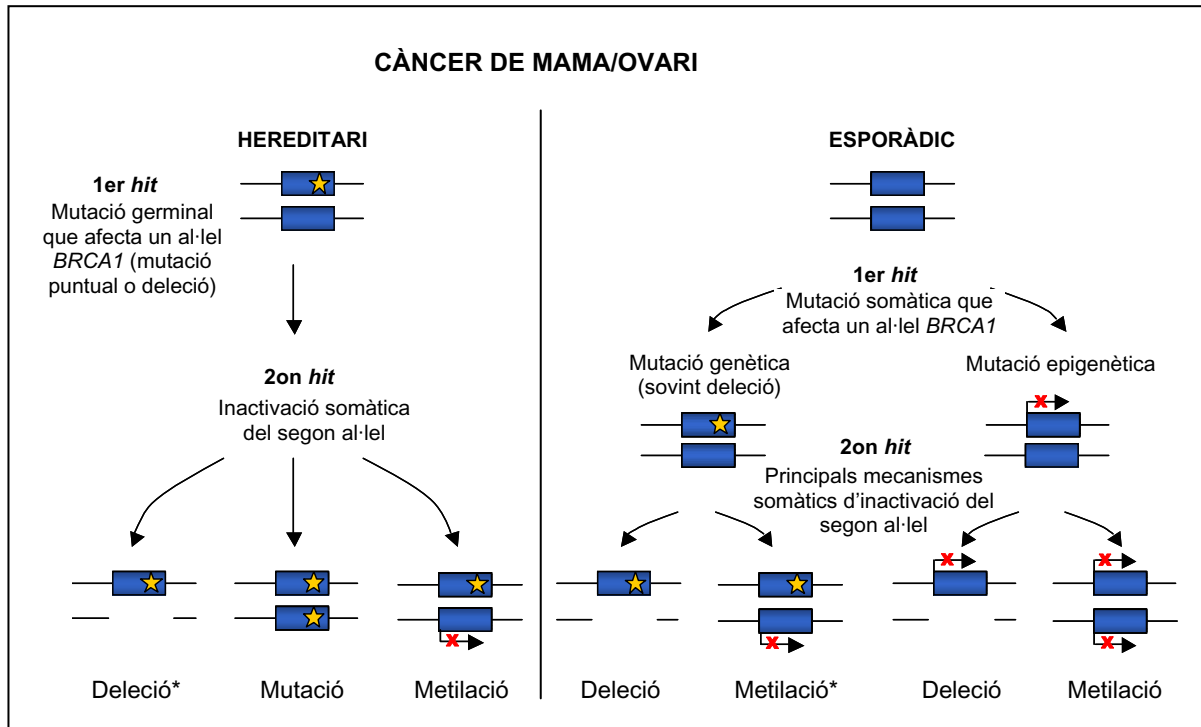


Figura 11 Inactivació del gen *BRCA1* en el càncer hereditari i esporàdic. Les mutacions genètiques actuen soles o en combinació amb mutacions epigenètiques. Els asteriscs (*) indiquen els mecanismes més freqüents en ambdós tipus de tumors. Modificat de Catteau i Morris, 2002.

3.1.2 Mutacions somàtiques en *BRCA1* i *BRCA2*

S'han identificat molt poques mutacions somàtiques en els gens *BRCA*, la majoria d'elles en tumors d'**ovari** (revisat per Chen *et al.*, 2005; Janatova *et al.*, 2005). En ***BRCA1***, dos estudis independents fets en pacients amb càncer d'ovari van obtenir percentatges de mutació similars: del **8,5%** (Merajver *et al.*, 1995) i del **6,8%** (Berchuck *et al.*, 1998). En ***BRCA2***, la incidència de mutacions somàtiques en aquests pacients va ser d'aproximadament el **4%** (Foster *et al.*, 1996; Hilton *et al.*, 2002).

Pel què fa als tumors esporàdics de **mama**, en el gen *BRCA1* fins al moment s'han identificat una mutació somàtica truncant (Khoo *et al.*, 1999) i un gran reordenament genòmic (van der Looij *et al.*, 2000b). En *BRCA2*, la freqüència de mutacions somàtiques és també molt baixa, amb dues mutacions truncants detectades en estudis fets en individus majoritàriament de poblacions caucàsiques (Weber *et al.*,

1996; Kwiatkowska *et al.*, 2002). Recentment, un estudi realitzat a Taiwan en què es va analitzar només l'exó 11 de *BRCA2* (Chen *et al.*, 2005), va trobar mutacions somàtiques en el 8,6% dels tumors, la majoria de tipus *missense*. Els autors suggereixen que a **Taiwan** les mutacions somàtiques en ***BRCA2*** podrien ser un mecanisme més habitual en la tumorigènesi del càncer de mama que a les poblacions caucàsiques. Alternativament, suggereixen que la paradoxa existent pel que fa a les mutacions en els gens *BRCA* (amb un paper central en el desenvolupament dels tumors hereditaris però aparentment ocasional en els esporàdics) podria ser deguda a l'escassetat d'estudis en tumors esporàdics comparats amb els hereditaris.

3.1.3 Pèrdua al·lèlica en els loci *BRCA1* i *BRCA2*

Com s'ha dit, la pèrdua al·lèlica es defineix també com a pèrdua d'heterozigositat (LOH), ja que representa una **reducció a l'homozigositat**, i és un procés que s'associa a la pèrdua de l'al·lel salvatge en tumors amb una mutació en un gen supressor de tumors. En *BRCA1* i *BRCA2*, és molt habitual en tumors de mama i ovari, tant de pacients portadors d'al·lels mutats com en casos esporàdics.

En tumors de **mama hereditaris**, nombrosos estudis han examinat la LOH dels loci *BRCA*. Per exemple, Staff *et al.* (2001) van trobar *LOH-BRCA1* en tots els tumors informatius de portadors *BRCA1* (15/15) i *LOH-BRCA2* en cinc dels sis tumors informatius de portadors *BRCA2*. De forma similar, Osorio *et al.* (2002) van trobar *LOH-BRCA1* en nou dels deu tumors de portadors *BRCA1*, i *LOH-BRCA2* en cinc dels sis tumors de portadors *BRCA2*.

En tumors de **mama esporàdics**, tot i que s'han identificat molt poques mutacions somàtiques en *BRCA1*, s'ha observat una expressió reduïda de proteïna *BRCA1* en el 30% dels casos (Yoshikawa *et al.*, 1999). En aquest sentit, s'ha trobat *LOH-BRCA1* en el 20-63% dels tumors (Beckmann *et al.*, 1996; Schmutzer *et al.*, 1997; Gentile *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 1999; Hanby *et al.*, 2000). De forma similar, les mutacions somàtiques en *BRCA2* són poc freqüents en els tumors de mama esporàdics, però s'ha trobat *LOH-BRCA2* en el 20-54% dels casos (Cleton-Jansen *et al.*, 1995; Schmutzer *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 1999; Hanby *et al.*, 2000).

3.1.4 Inactivació de *BRCA1*: metilació del promotor

Els mecanismes epigenètics d'inactivació al·lèlica són una alternativa potencial a la mutació gènica en el silenciament de gens supressors de tumors (Jones i Baylin, 2002). L'esdeveniment epigenètic més estudiat és la metilació anòmala dels residus citosina dels dinucleòtids CpG. Pel que fa al gen *BRCA1*, entre l'11 i el 14% dels tumors **esporàdics** de **mama** presenten una hipermetilació en el promotor del gen (Catteau *et al.*, 1999; Esteller *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 2000), així com el 5-31% dels tumors d'**ovari** (Catteau *et al.*, 1999; Baldwin *et al.*, 2000; Geisler *et al.*, 2002). En la majoria dels casos l'expressió de proteïna *BRCA1* és indetectable, fet que indica un

silenciament complet de l'expressió gènica com a conseqüència de la metilació (Baldwin *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2002; Staff *et al.*, 2003). La metilació de *BRCA1* no es troba en el teixit normal de mama i sembla que principalment es limita als tumors de mama i ovari. D'altra banda, diversos estudis mostren que la metilació del promotor *BRCA1* sovint s'associa a la pèrdua de l'altre al·lel en el *locus BRCA1* (Esteller *et al.*, 2000; Staff *et al.*, 2003).

Atès que probablement la pèrdua de *BRCA1* contribueix a la tumorigènesi accelerant la inestabilitat genòmica (vegeu apartat 1.5.7), la metilació de *BRCA1* hauria de ser un esdeveniment primerenc per tal de ser significatiu. Una evidència que dona suport a la importància etiològica de la metilació de *BRCA1* en la formació dels tumors esporàdics prové de la similitud de fenotips entre aquests tumors i els tumors amb mutació germinal en *BRCA1*. Esteller *et al.* (2001) van observar que, tot i que la majoria dels tumors **hereditaris** amb un al·lel *BRCA1* mutat presentaven LOH, un dels dos únics tumors que retenien els dos al·lells mostrava hipermetilació del promotor de *BRCA1* de l'al·lel salvatge, suggerint que es podia tractar del segon "hit" necessari per la formació del tumor. Més recentment, Alvarez *et al.* (2005), en un estudi que pretenia caracteritzar tres grups de tumors hereditaris (*BRCA1*, *BRCA2* i *BRCA1/2*), van trobar que gairebé la meitat dels tumors *BRCA1/2* (sense mutació identificada en *BRCA1* o *BRCA2*) presentaven metilació del promotor de *BRCA1*. A més, aquests tumors tenien característiques fenotípiques similars als tumors amb un *BRCA1* mutat, confirmant que la metilació és un mecanisme d'inactivació al·lèlica alternatiu a la mutació o a la pèrdua al·lèlica.

3.1.5 Inactivació de *BRCA2*: la proteïna EMSY

Al contrari que *BRCA1*, no hi ha evidències convincents d'un silenciament epigenètic per metilació del promotor de *BRCA2* en tumors **esporàdics** de mama (Collins *et al.*, 1997) o ovari (Hilton *et al.*, 2002). Recentment, però, s'ha descrit un possible mecanisme alternatiu d'inactivació de *BRCA2* que implica un nou gen anomenat *EMSY* (Hugues-Davies *et al.*, 2003). En aquest estudi, el 13% dels tumors de mama esporàdics primaris i el 17% dels tumors d'ovari esporàdics d'alt grau presentaven l'amplificació del gen *EMSY*. A més, els autors demostren que la proteïna *EMSY* s'uneix a l'exó 3 de *BRCA2* i és capaç de reprimir la seva funció d'activació transcripcional, localitzada en la regió N-terminal. Així, la unió d'*EMSY* a *BRCA2* provocaria una pèrdua de funció de *BRCA2* equivalent a la provocada per les mutacions intragèniques i la LOH. Encara manca establir, però, si els tumors esporàdics amb un gen *EMSY* amplificat representen una fenocòpia dels tumors amb mutació germinal en *BRCA2*.

3.1.6 Haploinsuficiència

L'heterozigositat de mutacions germinals en els gens *BRCA1* i *BRCA2* confereix una elevada susceptibilitat al càncer de mama i a altres tipus de tumors. No obstant, no està clar si l'heterozigositat per si mateixa representa un fenotip associat a

carcinogènesi i si afavoreix la pèrdua de l'al·lel salvatge. Recentment, s'ha suggerit l'existència d'un fenomen d'haploinsuficiència pel gen del retinoblastoma (Zheng *et al.*, 2002), fet que representaria una modificació del fins ara acceptat model carcinogènic de Knudson, ja que la inactivació d'un dels dos al·lells del gen seria suficient per promoure la progressió tumoral.

El paper de l'haploinsuficiència en la tumorigènesi s'ha estudiat durant els últims anys en diversos gens relacionats amb el càncer de mama, com són l'*ATM*, *LKB1*, *p53* i *PTEN* (revisat per Santarosa i Ashworth, 2004). Pel que fa als gens *BRCA1* i *BRCA2*, els resultats obtinguts en diversos tipus d'estudis són contradictoris, però hi ha indicis que la presència d'un al·lel mutat i, com a conseqüència, una dosi gènica menor, podria provocar defectes en els mecanismes de reparació, que afavoririen l'aparició d'errors en el DNA i la consegüent formació de tumors. En aquest sentit, i considerant el paper dels estrògens en la progressió tumoral (vegeu apartat 1.5.7), Noruzinia *et al.* (2005) proposen que les cèl·lules de la mama o l'ovari amb una inactivació monoal·lèlica de *BRCA1* o *BRCA2* podrien ser més sensibles a la carcinogènesi induïda pels estrògens.

3.2 CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DELS TUMORS *BRCA1* I *BRCA2*

A part de les diferències en els mecanismes d'inactivació al·lèlica acabades de mencionar, els tumors de mama d'origen hereditari presenten **característiques fenotípiques o patrons morfològics** particulars (taula 7), que semblen indicar una història natural **diferent** de la dels tumors **esporàdics** (Marcus *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 2004).

Taula 7 Característiques que diferencien els tumors de mama hereditaris (*BRCA*) dels esporàdics. Tret de Turner *et al.*, 2004.

Característica fenotípica	<i>BRCA1</i> %	Esporàdic %	<i>BRCA2</i> %	Referència
Alt grau ¹	66*	36	41*	BCLC (1997)
Infiltració limfocítica	13*	3	4 (NS)	Lakhani <i>et al.</i> (1998)
<i>Continuous pushing margins</i> ²	51*	20	36*	Lakhani <i>et al.</i> (1998)
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	41*	56	52 (NS)	BCLC (1997)
Carcinoma medul·lar o medul·lar atípic	13*	2	3 (NS)	BCLC (1997)
RE-	90*	35	34 (NS)	Lakhani <i>et al.</i> (2002)
HER2-	97*	85	97 (NS)	Lakhani <i>et al.</i> (2002)
Mutacions en <i>p53</i>	67*	35	63*	Crook <i>et al.</i> (1998)
Amplificació de <i>c-MYC</i>	53*	23-31	62,5*	Palacios <i>et al.</i> (2003), Grushko <i>et al.</i> (2004)
Fenotip basal en tumors RE-	88*	45	ND	Foulkes <i>et al.</i> (2003)

* Diferència estadísticament significativa; NS: no significatiu; ND: no determinat.

¹ Descripció patològica dels tumors que es divideixen ràpidament, són poc diferenciats i generalment es comporten amb agressivitat.

² Descripció patològica del patró d'invasió observat en els límits del tumor.

En la pràctica clínica, tot i que moltes de les característiques dels tumors associats a *BRCA1* o *BRCA2* apareixen també en tumors esporàdics de dones joves (Armes *et al.*, 1999), l'establiment de criteris histològics distintius podria ser útil en la selecció de pacients susceptibles de ser portadores de mutacions, especialment en els casos en què la història familiar no és determinant (Honrado *et al.*, 2005).

A més, diversos estudis d'hibridació genòmica comparativa (CGH) mostren que els tumors de mama de portadors de mutacions germinals en *BRCA1* i *BRCA2* contenen un gran nombre de guanys i pèrdues cromosòmiques (Tirkkonen *et al.*, 1997; Kainu *et al.*, 2000; Wessels *et al.*, 2002).

Tumors associats a mutacions germinals en *BRCA1*

Els tumors de mama de portadores de mutacions en *BRCA1* presenten un **fenotip histològic diferent** dels tumors esporàdics (taula 7). Diversos estudis han demostrat que els tumors associats a *BRCA1* tendeixen a ser d'alt grau (normalment grau 3) i, més específicament, amb un elevat grau mitòtic. Generalment mostren infiltració limfocítica, són més propensos a presentar marges expansius (*pushing margins*) i semblen tenir un menor grau de carcinoma ductal *in situ* associat que els tumors esporàdics. Tot i que la majoria dels tumors *BRCA1* són ductals infiltrants, s'ha observat una freqüència significativament més elevada de tumors medul·lars o medul·lars atípics. Altres estudis han observat un predomini de receptors d'estrògens negatius (RE-) i HER2 negatius (HER2-), així com una major amplificació de *c-MYC* i una freqüència més elevada de mutacions en el gen *p53*.

D'altra banda, els estudis d'expressió amb *microarrays* ha permès definir diversos subtipus de tumors de mama esporàdics, que probablement representen vies divergents d'evolució tumoral a partir d'una cèl·lula progenitora de l'epiteli mamari, i comparar-los fenotípicament amb els tumors hereditaris (Sorlie *et al.*, 2001 i 2003, Perou *et al.*, 2000, van't Veer *et al.*, 2002). Així, s'ha determinat que els tumors amb *BRCA1* mutat presenten un **fenotip** molt similar al dels tumors esporàdics de tipus **basal**, un subtipus de tumors de mama d'alt grau, alt índex de proliferació, ER- i HER2- caracteritzat per l'expressió de marcadors mioepitelials o cel·lulars basals com les citoqueratines CK5/6, CK14 i CK17, EGFR i P-caderina (Foulkes *et al.*, 2003; Sorlie *et al.*, 2003). Aquesta observació suggereix que ambdós tipus de tumors podrien compartir una etiologia similar.

Així, els tumors de mama amb **metil·lació** en el promotor de *BRCA1* s'associen sovint a un fenotip de tipus **basal** molt semblant al ja descrit pels tumors amb un *BRCA1* mutat (Esteller *et al.*, 2000). En aquest sentit, els tumors amb hipermetil·lació en *BRCA1* acostumen a ser d'un grau histològic elevat i ER- (Catteau *et al.*, 1999), i freqüentment mostren amplificació de *c-MYC* i pèrdua d'amplificació d'HER2 (Grushko *et al.*, 2004). No obstant, la proporció de tumors amb metil·lació en *BRCA1* que desenvolupen un fenotip basal és més baixa que en el càncer hereditari. Aquest fet podria reflectir que el silenciament epigenètic produït per la metil·lació del promotor de *BRCA1* fos incomplet i, possiblement, inespecífic.

Tumors associats a mutacions germinals en *BRCA2*

L'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant *microarrays* indica que els tumors *BRCA1*, *BRCA2* i esporàdics presenten una naturalesa diferent (Hedenfalk *et al.*, 2001). No obstant, a diferència dels tumors *BRCA1*, ha estat difícil definir característiques histopatològiques dels tumors *BRCA2* que permetin diferenciar-los dels esporàdics (taula 7). L'estudi del BCLC va trobar un grau una mica més elevat en tumors de portadores de mutacions en *BRCA2* que en els esporàdics, però l'efecte era menor que en els tumors *BRCA1* i semblava estar relacionat amb la pèrdua de la formació tubular, més que amb un elevat índex mitòtic (BCLC, 1997). La distribució dels receptors d'estrògens i de progesterona (PR) és similar a la dels no portadors, que acostumen a ser ER i PR positius (Jazaeri *et al.*, 2002).

4 ALTRES GENS DE SUSCEPTIBILITAT AL CÀNCER DE MAMA

Aproximadament un 80-85% dels casos de càncer de mama són esporàdics, mentre que el **15-20%** presenten un component d'**agregació familiar**. D'aquests, entre el **5** i el **10%** són heretats i apareixen principalment com a conseqüència de mutacions germinals en gens de susceptibilitat a càncer d'alta penetrància, com *BRCA1* i *BRCA2*. La resta dels casos familiars estarien causats per variants al·lèliques en gens de baixa penetrància, per factors no genètics, o ambdós (Nagy *et al.*, 2004).

Recentment, Wooster i Weber (2003) han proposat que *BRCA1* i *BRCA2* contribuïrien cadascun al **20%** dels casos de càncer de mama hereditari, definit per la presència de dos o més casos de càncer de mama diagnosticats abans dels 60 anys, mentre que el 60% restant seria degut a mutacions en gens de susceptibilitat addicionals (com *p53* i *CHEK2*, entre d'altres), juntament amb la interacció de diversos factors ambientals (figura 12).

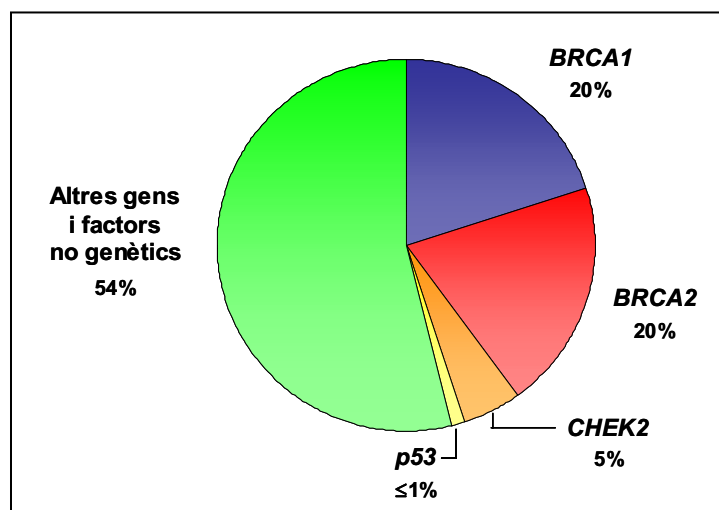


Figura 12 Gens de susceptibilitat al càncer de mama. Tret de Wooster i Weber, 2003.

4.1 GENS DE PENETRÀNCIA ALTA O MODERADA

Es coneixen diverses **síndromes de càncer familiar** que inclouen un augment considerable de la incidència de càncer de mama. Les més ben caracteritzades són la Síndrome de Cowden, la Síndrome de Li-Fraumeni i la Síndrome de Peutz-Jeghers, totes tres autosòmiques dominants i que apareixen principalment per mutacions germinals en els gens **PTEN**, **p53** i **STK11/LKB1**, respectivament. D'altra banda, diversos estudis mostren que mutacions en l'**ATM** en l'atàxia telangiectàsica, l'**NBS1** en la síndrome de Nijmegen i **CHEK2** en la síndrome de "Li Fraumeni-like", predisposen al càncer de mama, si bé amb un efecte més moderat sobre l'augment de risc.

Gen **PTEN**: Síndrome de Cowden

La síndrome de Cowden és una malaltia associada a un elevat risc de tumors benignes i malignes de tiroide, mama i endometri, a més d'alteracions dermatològiques característiques. La seva principal causa d'aparició són mutacions heretades en el gen supressor de tumors **PTEN** (*Phosphatase and Tensin Homolog*), que causen entre el **25** i el **50% de risc** de desenvolupar càncer de mama al llarg de la vida (Eng, 1998; Marsh *et al.*, 1998). La també anomenada Síndrome de l'hamartoma múltiple, representa menys de l'**1% dels casos** de càncer de mama hereditari.

Gen **p53**: Síndrome de Li-Fraumeni

La Síndrome de Li-Fraumeni es caracteritza per **càncer de mama precoç** (abans dels 40 anys) associat a diversos càncers infantils, com sarcomes i tumors cerebrals. L'aparició de la síndrome és causada per mutacions germinals en el gen **p53**, que codifica per una proteïna clau en la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi. Tot i que s'ha calculat que aquesta síndrome és responsable de menys de l'**1%** de tots els casos de càncer de mama (Sidransky *et al.*, 1992), les dones que arriben a l'edat adulta tenen més d'un **90% de risc** de desenvolupar la malaltia (Garber *et al.*, 1991). D'altra banda, en un estudi realitzat en dones diagnosticades de càncer de mama abans dels 31 anys (Laloo *et al.*, 2003) es van trobar mutacions en el 4% de les pacients, algunes d'elles sense història familiar. Aquesta dada suggereix la participació de **p53** en el càncer de mama molt precoç i la conveniència de la seva anàlisi en dones joves afectes.

Gen **STK11/LKB1**: Síndrome de Peutz-Jeghers

La síndrome de Peutz-Jeghers es caracteritza per pòlips hamartomatosos i màcules cutànies i està causada principalment per mutacions en el gen **STK11** (*Serine/Threonine Kinase 11*), també anomenat **LKB1** (Hemminki *et al.*, 1998; Jenne *et al.*, 1998). En un estudi recent (Schumacher *et al.*, 2005), fet en individus amb síndrome de Peutz-Jeghers no seleccionats per la història familiar, es va identificar una mutació **STK11** en el 66% dels pacients. Els individus amb mutacions germinals presenten un risc augmentat de patir diversos tipus de càncer al llarg de la vida, com càncer de mama, pàncrees, endometri i ovari (Boardman *et al.*, 1998). Segons

aquest estudi, en dones portadores el risc de desenvolupar un tumor de mama o algun tipus de tumor **ginecològic** al llarg de la vida és d'unes **20 vegades** superior al de les no portadores.

Gen ATM: Atàxia Telangiectàsica

L'atàxia telangiectàsica (AT) és una síndrome **recessiva** d'inestabilitat genètica caracteritzada per degeneració neuronal progressiva, deficiència immunològica, radiosensibilitat i predisposició a diversos càncers, sobretot leucèmies i limfomes infantils. Gairebé tots els casos d'AT s'associen a mutacions en el gen *ATM* que codifica per una proteïna amb un paper central en la reparació del DNA i el control del cicle cel·lular (Savitsky *et al.*, 1995). La majoria de pacients són heterozigots compostos.

Nombrosos estudis suggereixen que els individus **portadors** d'una mutació en el gen *ATM* tenen un major risc de desenvolupar **càncer de mama** que els no portadors, amb un risc relatiu d'entre **2,4** i **4,4** (Swift *et al.*, 1987; Easton *et al.*, 1994; Geoffroy-Perez *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2001). S'estima que aproximada-ment 1 de cada 100 persones podria ser portadora d'una mutació en l'*ATM* i s'ha suggerit que les mutacions en aquest gen podrien ser l'alteració genètica responsable del **5%** de tots els casos de càncer de mama. No obstant, en la majoria d'estudis no s'han trobat diferències significatives entre les freqüències de mutacions en pacients amb càncer de mama i en individus controls (FitzGerald *et al.*, 1997; Bebb *et al.*, 1999; Izatt *et al.*, 1999; Shafman *et al.*, 2000; Buchholz *et al.*, 2004).

Un treball recent (Thompson *et al.*, 2005), basat en l'anàlisi de 1.160 familiars de pacients amb AT mostra el **dobte** de risc de càncer de mama en dones portadores de mutacions *ATM* que en no portadores, amb un risc relatiu més elevat en dones menors de 50 anys. Els autors suggereixen que les mutacions en l'*ATM* confereixen un **efecte moderat** en l'augment del risc al càncer de mama.

Gen NBS1: Síndrome de Nijmegen

La síndrome de Nijmegen és una síndrome autosòmica **recessiva** caracteritzada per microcefàlia, retard del creixement, immunodeficiència i predisposició a diversos càncers, similar a l'AT i l'anèmia de Fanconi. La malaltia apareix per mutacions en el gen *NBS1* (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*), que forma part del complex MRE11/RAD50/NBS1 i intervé en la reparació del dany al DNA induït per radiacions ionitzats (Varon *et al.*, 1998), juntament amb l'*ATM*, els gens *FANC* i els gens *BRCA*.

Les mutacions germinals en l'*NBS1* són molt poc freqüents en la majoria de poblacions i la seva implicació en el càncer de mama familiar és en general molt baixa. En canvi, en poblacions amb efectes fundadors pot representar una part significativa dels casos. Un exemple és la mutació eslava **657del5**, la qual es va detectar en el **3,7%** de les dones amb càncer de mama hereditari, comparat amb el 0,6% de la població control (Gorski *et al.*, 2003).

Gen *CHEK2*

El gen *CHEK2* codifica per una proteïna que participa en el control del cicle cel·lular i la reparació del DNA juntament amb *BRCA1* i *p53*. Recentment, s'ha suggerit que la mutació **1100delC**, identificada en una petita proporció de famílies amb síndrome de Li-Fraumeni (Bell *et al.*, 1999) i que es troba amb una freqüència inferior a l'1% a la població, podria actuar com un al·lel de **baixa penetrància** en la susceptibilitat al càncer de mama (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002). Segons els autors, l'al·lel 1100delC confereix un augment del risc de l'**1,7**, equivalent a un risc al llarg de la vida inferior al **20%**. Tot i que la seva prevalença no era superior en els casos de càncer de mama no seleccionats (1,4%), el **5,1%** dels casos hereditaris sense mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* presentava la variant. A més, en determinats grups la proporció de casos amb l'al·lel 1100delC augmentava fins el 13,5% (homes amb càncer de mama) (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002) o el 12,1% (pacients amb càncer de mama bilateral) (Vahteristo *et al.*, 2002).

El primer estudi fet en **població espanyola** (Osorio *et al.*, 2004) en 456 casos de càncer de mama hereditari sense mutacions identificades en *BRCA1* o *BRCA2* i en 400 controls, no va trobar cap individu amb la variant 1100delC. Posteriorment, en un estudi realitzat al País Basc (regió no inclosa en l'estudi anterior) es va identificar la mutació en l'**1,1%** dels 181 pacients amb càncer de mama o ovari analitzats, i en cap dels 120 individus del grup control (Martínez-Bouzas *et al.*, 2005). En qualsevol cas, sembla que la freqüència de l'al·lel en la nostra població seria molt inferior a la trobada en diverses poblacions del nord d'Europa.

4.2 GENS DE BAIXA PENETRÀNCIA I FACTORS MODIFICADORS

Els gens de baixa penetrància són gens polimòrfics amb al·lells específics comuns en la població i associats a un augment de la susceptibilitat al càncer de mama.

4.2.1 El model poligènic

Després del descobriment dels gens *BRCA1* i *BRCA2* ja es va suggerir l'existència d'altres gens de susceptibilitat al càncer de mama (Peto *et al.*, 1996). Un estudi fet en 237 famílies amb almenys 4 casos de càncer de mama (Ford *et al.*, 1998), va confirmar que, si bé les mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* explicaven la major part de les famílies d'alt risc, només una petita proporció de les famílies amb 2 o 3 casos presentaven una mutació en un d'aquests dos gens. Mutacions en gens com *PTEN*, *p53* i *LKB1/STK11* confereixen un augment considerable del risc de càncer de mama però en la majoria de poblacions són poc freqüents i representen només una petita proporció dels casos de càncer de mama hereditari.

Estudis recents semblen indicar l'existència d'una **causa poligènica** segons la qual, un gran nombre d'**al·lells de baixa penetrància** (cadascun dels quals conferiria un augment de risc de l'orde d'**1,5-2,0**) es combinarien per conferir un interval de susceptibilitats en la població. Mentre que els individus amb pocs al·lells de baixa

penetrància tindrien un baix risc de patir càncer, els individus amb molts al·lels podrien tenir un **risc** del **50%** al llarg de la vida (Peto, 2002; Pharoah *et al.*, 2002).

Durant els últims anys, la caracterització dels components de les vies de senyalització que impliquen *BRCA1* i *BRCA2* ha impulsat la recerca de variants al·lèliques que confereixin un risc augmentat de càncer de mama. S'han examinat un gran nombre de **gens candidats**, suposadament rellevants pel desenvolupament tumoral, principalment mitjançant **estudis cas-control**. En aquests tipus d'estudis s'analitzen directament les associacions entre les variants polimòrfiques i el risc de càncer, expressades com *odds ratio* (OR). Malgrat tot, només ha estat possible identificar un reduït nombre de *loci* amb tota certesa. En una revisió de 46 estudis sobre els efectes de polimorfismes comuns en 18 gens en el risc de càncer de mama (Dunning *et al.*, 1999), l'anàlisi combinada va identificar diferències significatives només en tres polimorfismes: **CYP19-(TTTA)₁₀**, **GSTP1-Ile105Val** i **p53-Arg72Pro** (taula 8).

Taula 8 Associacions entre polimorfismes al·lèlics i el risc de càncer de mama. Modificat de Dunning *et al.*, 1999.

Gen/polimorfisme	Nº d'estudis (total casos)	Grup de risc	OR combinada (95% CI)
Gens del metabolisme d'hormones esteroides			
COMT Val158Met	3 (1401)	Val/Met	0,88 (0,75-1,05)
		Met/Met	0,86 (0,67-1,09)
CYP17 promotor T→C	4 (1242)	Portador C	1,10 (0,93-1,30)
CYP19 (TTTA) _n	4 (1777)	Portador (TTTA) ₁₂	1,26 (0,91-1,74)
		Portador (TTTA) ₁₀	2,33 (1,36-4,17) *
ER CCC325CCG	2 (468)	Portador G	1,25 (0,94-1,68)
PR PROGINS	3 (547)	T1/T2	0,97 (0,73-1,28)
		T2/T2	0,41 (0,15-0,95)
CYP1A1 Ile462Val	4 (927)	Portador Val	0,94 (0,68-1,30)
CYP1A1 3'UTR T6245C	3 (750)	Portador C	1,20 (0,91-1,58)
Gens del metabolisme de carcinògens			
CYP2D6	6 (1126)	Metabolitzador pobre	1,36 (0,96-1,91)
GSTM1 deleció	4 (1553)	Nul	1,14 (0,97-1,35)
GSTT1 deleció	2 (333)	Nul	1,18 (0,81-1,73)
GSTP1 Ile105Val	2 (172)	Portador Val	1,60 (1,08-2,39) *
NAT1 A1088T	2 (652)	Portador T	1,07 (0,82-1,39)
NAT2	4 (1584)	Acetilador lent	0,97 (0,84-1,13)
Supressor tumoral			
p53 Arg72Pro	3 (412)	Portador Pro	1,27 (1,02-1,59) *
p53 intró 6 A → G	4 (563)	AG	1,16 (0,91-1,47)
		AA	0,84 (0,32-1,79)
p53 intró 3 ins16pb	3 (527)	A1/A1	1,02 (0,79-1,31)
		A2/A2	0,89 (0,39-1,79)

* Diferència estadísticament significativa.

4.2.2 Gens modificadors del risc en portadors de mutacions en *BRCA1* o *BRCA2*

Algunes de les variants polimòrfiques en gens de baixa penetrància, així com la interacció de factors ambientals, poden modificar el risc en portadors de mutacions en gens majors de susceptibilitat. En el càncer de mama i ovari hereditari s'han suggerit diversos gens com a potencials modificadors del risc en portadors de mutacions en *BRCA1* o *BRCA2*, la majoria d'ells relacionats amb el metabolisme de les hormones sexuals i amb la reparació del DNA. La seva evidència, però, és encara massa dèbil per ser utilitzats en la pràctica clínica. Alguns d'aquests gens s'inclouen en la taula 9.

Taula 9 Efecte de gens modificadors en el risc de càncer de mama i d'ovari. Modificat de Narod, 2002.

	Càncer de Mama		Càncer d'Ovari	
	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
<i>AR</i>	↓↑	?	↓↑	?
<i>NCOA3</i>	↑	?	?	?
<i>RAD51</i>	–	↑	?	?
<i>HRAS1</i>	?	?	↑	?

↑ : augment de risc; ↓ : disminució del risc; – : no s'observa efecte modificador; ? : no estudiat; ↓↑ : els polimorfismes en l'*AR* podrien disminuir o augmentar el risc en portadors de mutacions en *BRCA1*, depenent del genotip específic.

En alguns casos s'ha descrit l'efecte d'una o més variants al·lèliques en l'edat d'aparició del tumor. Per exemple, Osorio *et al.* (2006) van analitzar l'efecte de dos polimorfismes en el gen **p53**: Ins16pb i Arg72Pro, i van comprovar que un haplotip específic, amb l'al·lel sense la inserció de 16 pb i l'al·lel Arg72Pro (haplotip *No ins-72Pro*), augmenta la precocitat en portadors de mutacions en *BRCA2*.

Gen *AR*

El gen de **receptor d'andrògens** (*AR*, d'*Androgen Receptor*) conté un tram de poliglutamines polimòrfic, amb un nombre variable de codons **CAG**, que en la població general es troba entre 17 i 26. *In vitro*, el grau de transactivació del receptor per part de l'androgen varia de forma inversament proporcional a la longitud de la repetició (Chamberlain *et al.*, 1994). En un estudi d'associació (Giguere *et al.*, 2001), les dones amb una mitjana de 19,5 o menys repeticions presentaven la meitat de risc de càncer de mama que les dones amb una mitjana de 20 o més unitats. Aquests resultats indiquen que un increment de l'activitat androgènica s'associa a un menor risc de càncer de mama, però dos estudis anteriors no havien mostrat aquesta associació (Dunning *et al.*, 1999; Spurdle *et al.*, 1999).

D'altra banda, BRCA1 és un coactivador del receptor d'andrògens (Park *et al.*, 2000). En un estudi en portadores de mutació en *BRCA1* (Rebbeck *et al.*, 1999), les dones amb més de 27 repeticions CAG s'havien diagnosticat de càncer de mama a una edat més jove que aquelles amb dos al·lells més curts, d'acord amb la teoria que una major activitat androgènica és protectora. Un altre estudi, però, realitzat en dones jueves portadores d'una mutació en *BRCA1* o *BRCA2*, no confirmava aquest efecte (Dagan *et al.*, 2002).

Pel que fa al càncer d'ovari, les dades d'un estudi fet en dones jueves amb càncer d'ovari i portadores de mutació en *BRCA1* mostraven que les dones amb un al·lel més curt del gen *AR* eren diagnosticades a una edat més jove que aquelles sense un al·lel curt (Levine i Boyd; 2001a). Aquesta observació concorda amb el fet que les dones amb concentracions elevades d'andrògens en sang tenen més risc de desenvolupar càncer d'ovari (Helzlsouer *et al.*, 1995).

Conjuntament, aquests estudis indiquen que la influència de l'activitat androgènica sobre el risc de càncer de mama i d'ovari podria exercir-se en direccions oposades. Malgrat tot, fins al moment no hi ha prou dades per extreure'n conclusions definitives.

Gen *NCOA3*

El gen *NCOA3* (*Nuclear Receptor CoActivator 3*) codifica per un **coactivador del receptor d'estrògens** i està amplificat en el 10% dels tumors de mama i sobreexpressat en el 64% (Anzick *et al.*, 1997). Com el receptor d'andrògens, l'*NCOA3* conté un polimorfisme de repeticions **CAG** que genera un tram de poliglutamines. Dos estudis fets en dones portadores de mutació en *BRCA1* o *BRCA2* mostren que un major nombre de repeticions s'associa a un augment de risc de càncer de mama, mentre que els al·lells més curts tindrien un efecte protector (Rebbeck *et al.*, 2001; Kadouri *et al.*, 2004). En un estudi més recent, però, no s'ha confirmat aquesta associació (Wilkening *et al.*, 2005).

Gen *RAD51*

Com s'ha vist en punts anteriors, la proteïna RAD51 està implicada en la **reparació** dels talls de doble cadena al DNA i interacciona tant amb *BRCA1* com amb *BRCA2*. En dos estudis paral·lels, un polimorfisme en la regió 5' no traduïda del gen *RAD51* es va associar a un risc augmentat de càncer de mama en portadores de mutació en *BRCA2*, però no en *BRCA1* (Levy-Lahad *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). D'altra banda, un estudi recent de diversos gens relacionats amb la via de reparació de *RAD51* (Rodríguez-López *et al.*, 2004), ha identificat una variant en el gen ***RAD51D* (E233G)**, significativament més freqüent en famílies d'alt risc (no portadores de mutacions en *BRCA*) que en controls i altres grups de pacients amb càncer de mama. Són necessaris més estudis per aclarir si es tracta d'un al·lel de susceptibilitat al càncer de mama de baixa penetrància.

Gen *HRAS*

El cromosoma 11 conté un polimorfisme consistent en un nombre variable de repeticions en tàndem (**VNTR**, de *Variable Number of Tandem Repeats*), situat a una quilobase del **protooncogèn** *HRAS*. Alguns dels al·lells són infreqüents i s'ha proposat que la seva presència és un factor de risc per a diversos tipus de càncers (Krontiris *et al.*, 1993). En un estudi fet en portadores de mutació en *BRCA1* (Phelan *et al.*, 1996), es va associar la presència d'un o dos al·lells rars del polimorfisme al doble de risc de patir càncer d'**ovari**, però no de mama.

4.2.3 Factors modificadors no genètics

A part de la presència de variants al·lèliques en gens de baixa penetrància, diversos estudis epidemiològics han identificat un nombre considerable de factors no genètics que modifiquen el risc de càncer de mama i ovari. En la població general, un major **nombre de fills** és un factor protector tant pel càncer de mama com pel d'ovari (Whittemore *et al.*, 1992; Clavel-Chapelon *et al.*, 2002). L'efecte de la paritat en portadores és menys clar, però la majoria d'estudis mostren també una reducció del risc semblant a la de la població general (Modan *et al.*, 2001; Rebbeck *et al.*, 2001; Tryggvadottir *et al.*, 2003). D'altra banda, un estudi de tipus cas-control a gran escala va trobar que l'ús d'**anticonceptius orals** estava associat a un lleuger increment del risc de càncer de mama en portadores *BRCA1*, però no en *BRCA2* (Narod *et al.*, 2002). Un altre estudi va mostrar que una **ooforectomia profilàctica** podria reduir considerablement el risc de càncer de mama en portadores de mutacions en *BRCA1* (Rebbeck *et al.*, 1999). L'efecte d'altres factors de risc coneguts en la població general, com la **lactància**, l'**excés de pes** i el **consum d'alcohol** no s'han pogut establir de forma clara en dones portadores de mutacions en els gens *BRCA*.

D'altra banda, en un estudi recent de King *et al.* (2003) es va comprovar l'existència d'un efecte de cohort relacionat amb l'**any de naixement**: les dones portadores de mutació en *BRCA1* o *BRCA2* i nascudes abans de l'any 1940 tenien menys risc de patir càncer de mama que les portadores nascudes amb posterioritat (24% i 67% al 50 anys, respectivament). Els autors suggereixen que la diferència entre les dues cohorts podria ser conseqüència de diferències ambientals, dietètiques i reproductives/hormonals, com una **edat precoç de la menarquia**, un conegut factor de risc més comú en generacions recents.

5 CONSELL GENÈTIC EN LA PREDISPOSICIÓ HEREDITÀRIA AL CÀNCER DE MAMA I OVARI

Amb la identificació dels gens *BRCA1* i *BRCA2* ha esdevingut possible oferir un diagnòstic genètic a individus a risc. Malgrat tot, la proporció de càncers de mama i d'ovari deguts a alteracions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* és molt baixa i l'anàlisi molecular dels gens *BRCA* és un procés car i complex. A més, el resultat obtingut no és sempre informatiu i pot generar ansietat o problemes psicosocials en els individus estudiats i les seves famílies. Per aquestes raons, s'estableixen **critèris de selecció** dels individus o pacients a qui oferir el diagnòstic genètic, basats en la història personal i familiar, que suggereixen una causa genètica. Per altra banda, s'han desenvolupat **models de càlcul** per avaluar el risc individual de desenvolupar càncer o de ser portador d'una mutació en *BRCA*, en funció d'aquests antecedents clínics personals o familiars.

5.1 SELECCIÓ DE LES FAMÍLIES I PACIENTS

Avaluació del risc de desenvolupar càncer

Abans del descobriment dels gens *BRCA* es van elaborar diversos mètodes per **avaluar el risc de desenvolupar càncer**. Els més coneguts són el model de Gail i el de Claus. El **model de Gail** utilitza cinc variables per calcular el risc: l'edat al diagnòstic, edat en el primer embaràs, edat a la menarquia, nombre de familiars de primer grau amb càncer de mama, i nombre de biòpsies de mama realitzades (Gail *et al.*, 1989). Amb aquestes variables es calcula el risc específic per edat. El model de Gail no valora bé el risc en tots els casos ja que no considera la presència de càncer de mama en els familiars de segon grau i tampoc té en compte la presència de càncer d'ovari en la família. D'altra banda, el **model de Claus** es podria aplicar millor a les dones amb càncer de mama hereditari perquè té en compte els nombre de casos en la família i les edats al diagnòstic dels membres afectes (Claus *et al.*, 1991). Com l'anterior, no considera antecedents de càncer d'ovari. Ambdós models infraestimen el risc individual de càncer de mama en famílies portadores de mutació *BRCA*, mentre que sobreestimen el risc en no portadores.

Càlcul de la probabilitat de detectar una mutació en *BRCA1* o *BRCA2*

S'han desenvolupat diversos models matemàtics que permeten calcular la probabilitat d'un individu de ser portador d'una mutació patogènica en *BRCA1* o *BRCA2*. Com els anteriors, aquests mètodes es basen en els antecedents individuals i en la història familiar de càncer de mama i d'ovari (Berry *et al.*, 1997; Couch *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1998; Parmigiani *et al.*, 1998; de la Hoya *et al.*, 2002). Aquests i altres estudis van indicar les característiques que acompanyaven una alta probabilitat de ser portador: existència d'**antecedents familiars**, presència de **càncer d'ovari** (sobretot per *BRCA1*) i **aparició precoç del càncer de mama**.

El model de Couch estima la probabilitat de trobar una mutació en una família amb almenys un cas de càncer de mama i es basa en l'edat mitja del càncer de mama en la família de la provand (Couch *et al.*, 1997). Altres factors considerats són la història familiar de càncer de mama o la de càncer de mama i ovari. Una limitació del model és que es basa en un nombre relativament petit de famílies amb una mitjana de 3,5 casos de càncer de mama (164 dones en total) i només té en compte les mutacions en *BRCA1*, si bé només inclou dones caucàsiques (s'exclouen per tant les dones d'origen jueu asquenasa). Prediu una mutació en *BRCA1* només en el 16% de les dones amb història familiar de càncer de mama i en el 7% de les famílies amb història de càncer de mama. Les mutacions en *BRCA1* no s'associen amb la presència de càncer de mama bilateral ni amb el nombre de familiars afectes.

El model de Frank (Myriad Genetics), estima la probabilitat que una dona amb càncer de mama diagnosticat abans dels 50 anys sigui portadora d'una mutació en *BRCA1* o *BRCA2* basant-se exclusivament en la història personal i familiar (taula 10) (Frank *et al.*, 1998).

Taula 10 Probabilitat estimada de ser portadora en dones amb càncer de mama diagnosticat abans dels 50 anys. Tret de Frank *et al.*, 1998.

Algun familiar: CM < 50 anys?	Algun familiar: CO?	Provand: CM bilat o CO?	Provand: CM < 40 anys?	Probabilitat mut <i>BRCA1</i> %	Probabilitat mut <i>BRCA2</i> %	Probabilitat mut <i>BRCA</i> %
•				10,1	14,5	25
•			•	28,2	11,6	40
•		•	•	41,5	9,5	51
•		•	•	71,1	4,7	76
	•			22,9	12,5	35
	•		•	22,9	12,5	35
	•	•		65,0	5,7	71
	•	•	•	65,0	5,7	71
•	•			22,9	12,5	35
•	•		•	50,9	7,9	59
•	•	•		65,0	5,7	71
•	•	•	•	86,7	2,2	89

Bilat: bilateral; CM: càncer de mama; CO: càncer d'ovari; mut: mutació

Aquest model es va desenvolupar a partir d'una mostra de 238 dones amb càncer de mama diagnosticat abans dels 50 anys o amb càncer d'ovari i, almenys, un familiar de primer o segon grau. És útil per predir la probabilitat de trobar una mutació en una família, determinant el grau de relació amb la provand. Així, els familiars de primer grau no afectes tenen la meitat de probabilitat de patir càncer de mama, respecte al familiar afecte; els familiars de segon grau tenen un 25% de probabilitat, etc. Aquest model és més aplicable a famílies amb diverses dones diagnosticades de càncer de mama abans dels 50 anys o amb càncer d'ovari a qualsevol edat, excloent les dones amb càncer de mama diagnosticades després dels 50 anys.

En aquest treball van observar també que la presència d'**homes amb càncer de mama** en la família era un factor predictiu de mutació en *BRCA2*, però el nombre de famílies amb aquestes característiques era massa baix per obtenir un valor significatiu i no es va incloure en els càlculs de probabilitats.

El model BRCAPRO, desenvolupat per Berry i Parmigiani (Berry *et al.*, 1997; Parmigiani *et al.*, 1998), utilitza un mètode matemàtic probabilístic basat en l'herència mendeliana i aplica les bases del teorema de Bayes. Estima la probabilitat individual de ser portador d'una mutació en *BRCA1* o *BRCA2*, segons la història familiar. Aquest model es basa en l'edat al diagnòstic i la incidència acumulada de càncer de mama i ovari en pacients portadores de mutació *BRCA*, comparada amb les no portadores. El càlcul final de probabilitat incorpora l'edat i la informació de la història familiar de càncer dels familiars de primer i segon grau, segons l'herència mendeliana dels gens autosòmics dominants. La limitació d'aquest estudi es deu a que la mostra seleccionada per establir-lo es compon de dones amb una important història familiar de càncer de mama i ovari. Per tant, aquest model prediu de forma correcta quan la família estudiada té un alt risc de presentar una mutació en *BRCA1* o *BRCA2*.

Per últim, **el model de de la Hoya** estima la probabilitat de presentar una mutació en *BRCA1* o *BRCA2* mitjançant el desenvolupament d'una regressió logística (de la Hoya *et al.*, 2002). Es van seleccionar 102 famílies espanyoles amb almenys 3 casos de càncer de mama o ovari (amb almenys un cas diagnosticat abans del 50 anys). Aquest model té en compte el nombre de casos de càncer de mama i ovari en una mateixa persona, la presència de càncer de mama bilateral, el càncer de mama en homes i la mitjana de l'edat al diagnòstic de càncer de mama. Els autors estimen que el seu valor predictiu positiu és de 77,4% i el valor predictiu negatiu de 79%.

Diversos treballs posteriors han avaluat la validesa d'aquests models de predicció comparant els resultats de l'anàlisi genètica dels gens *BRCA1* i *BRCA2* amb les probabilitats estimades de ser portador (Berry *et al.*, 2002; de la Hoya *et al.*, 2003). Per exemple, en un estudi fet en 301 individus (Berry *et al.*, 2002), es va avaluar el programa informàtic BRCAPRO. Dels 150 provands que segons BRCAPRO tenien menys probabilitat de ser portadors (mitjana: 29,0%), la proporció de positius va ser del 32,7%, i dels 151 provands amb una probabilitat més elevada (mitjana: 95,2%), el 78,8% presentaven una mutació. Els autors suggereixen que BRCAPRO un mètode força precís, amb una sensibilitat del **85%** i amb falsos negatius, que inclouen mutacions en altres gens de susceptibilitat.

En qualsevol cas, tots els models descrits presenten limitacions respecte als gens considerats o a l'origen de la mostra poblacional (amb dades de prevalença i incidència de càncer diferents a la nostra) i cap d'ells no té en compte el nombre d'individus no afectats de la família respecte al nombre d'afectats. En general, els models són útils per orientar en l'assessorament genètic i validar les dades posteriorment obtingudes, però s'han d'utilitzar sense substituir el criteri i el coneixement del personal experimentat en consell genètic en càncer hereditari.

Criteris de selecció

Els criteris de selecció utilitzats en diferents centres tenen en compte fonamentalment el nombre d'individus afectats i e casos de càncer en la família i l'edat al diagnòstic, si bé presenten algunes diferències. A Catalunya, en les Oncogüies de consell i assessorament genètics en càncer hereditari, recentment elaborades, es proposen els següents criteris genèrics de selecció per a l'anàlisi genètica dels gens *BRCA1* i *BRCA2*:

- Tres o més casos de càncer de mama / ovari
- Dos casos de càncer de mama / ovari (almenys un càncer de mama diagnosticat abans dels 50 anys o bilateral)
- Càncer de mama / ovari i almenys un cas de càncer de mama en home
- Un cas de càncer de mama (abans dels 30 anys o abans dels 40 anys i bilateral) o bé càncer de mama i ovari
- Un cas de càncer de mama en home

5.2 INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS DE LES PROVES GENÈTIQUES

La interpretació correcta dels resultats individuals constitueix un aspecte principal de l'assessorament genètic posterior a l'anàlisi molecular. Els possibles resultats i les seves implicacions es resumeixen a continuació.

Interpretació dels resultats positius

La identificació d'una mutació patogènica en un individu explica el patró de càncer en la família i permet la detecció directa de la mutació en altres membres de la família. A més, indica que el portador té un risc incrementat de neoplàsia.

L'estimació exacta del risc individual en un portador és problemàtica, degut a la seva dimensió temporal. Malgrat que la probabilitat de desenvolupar càncer sigui molt elevada al llarg de la vida, és molt incerta en els anys immediats a la detecció de la mutació, període de màxim interès per a la pacient i en el qual s'han de prendre decisions clíniques. Les famílies en les quals s'han deduït patrons de risc, sovint presenten molts membres afectats joves i, probablement, comparteixen alhora altres factors de risc, de manera que l'efecte de les mutacions en *BRCA1* o *BRCA2* ha estat sobrevalorat respecte al de la població general, però es desconeix fins a quin punt. Per caracteritzar el risc associat (penetrància) a mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* calen més estudis poblacionals amb dones no seleccionades a partir d'una història familiar d'alt risc. D'altra banda, com ja s'ha explicat, **gens modificadors, la història reproductiva o factors ambientals**, entre d'altres, poden alterar individualment els efectes d'una mutació en *BRCA1* o *BRCA2*. Per tant, una mateixa mutació pot estar associada a diversos graus de risc i a diferents tipus de càncer, fins i tot, entre els components d'una mateixa família, complicant la possibilitat de prediccions individuals (Simard *et al.*, 1994; Thorlacius *et al.*, 1996; Tonin *et al.*, 1996).

Interpretació dels resultats negatius

Resultat veritable negatiu (absència de la mutació familiar)

Un cop identificada una mutació en el provand, la seva absència en un parent a risc és un resultat negatiu cert. Permet establir amb certesa en aquest individu, l'absència del risc associat a la mutació en ell i en els seus descendents, si bé no exclou el risc de la població general. No obstant això, cal tenir en compte situacions particulars, com ara la possibilitat de l'existència de dues mutacions quan l'arbre familiar ho suggereixi. La **dobla heterozigositat** per mutacions germinals en *BRCA1* i *BRCA2* és un fenomen poc freqüent, amb una incidència del **0,22-0,87%** entre els portadors de mutacions *BRCA*, encara que en individus jueus asquenasites podria assolir l'**1,8%** (Leegte *et al.*, 2005). Els autors presenten els resultats de l'anàlisi de 34 casos de doble heterozigositat, els quals indiquen que aquests individus no presenten un fenotip més greu que els portadors d'una única mutació en un dels dos gens. Per altra banda, quan l'individu pertany a algun grup ètnic d'alt risc, seria recomanable estudiar la presència de les mutacions més comunes en aquesta població.

Resultat negatiu indeterminat (no detecció de mutació)

Quan no s'ha identificat una mutació ni en *BRCA1* ni en *BRCA2* en un individu afecte d'una família d'alt risc, el resultat negatiu **no és informatiu**. D'una banda s'ha de considerar l'existència d'una mutació germinal no detectada pels mètodes utilitzats (**fals negatiu**). Per altra banda, l'individu podria ser portador d'una mutació en algun **altre gen** de susceptibilitat, l'agrupació familiar de càncer de mama i ovari podria ser el reflex de **riscs genètics més dèbils o ambientals** o, fins i tot, ser casual, degut a l'alta prevalença de càncers de mama esporàdics. En aquests casos s'aconsella fer una estimació del risc i seguir les recomanacions basades en la història familiar. Caldria valorar també, si hi ha un familiar amb un major risc de ser portador o si apareix en el futur.

De la mateixa manera, en les famílies sense resultats caldria actualitzar la informació i ampliar l'anàlisi quan fos possible, amb la incorporació de noves tècniques o variacions de les existents. Per exemple, la tècnica de MLPA ha permès a molts laboratoris afegir l'anàlisi rutinari de grans reordenaments dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, fins aleshores un procés molt laboriós i poc factible.

Interpretació de les variants d'efecte biològic desconegut

Durant el procés de detecció de mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* sovint s'identifiquen mutacions d'efecte biològic desconegut i, per tant, de significat clínic incert. Tot i que existeixen diversos mètodes per aclarir el seu caràcter benigne o patològic (vegeu 2.6), normalment són aproximacions poc factibles dins d'un estudi clínic. En aquests casos, l'estimació del risc i les recomanacions s'han de basar en la història personal i familiar i, recentment, s'han proposat diverses recomanacions per a l'assessorament genètic d'aquestes famílies (Vink *et al.*, 2005). En qualsevol cas, és imprescindible recollir permanentment tota nova informació apareguda sobre cada variant, ja que pot modificar de manera substancial l'assessorament genètic de les famílies portadores en el futur.

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest treball és l'estudi molecular dels gens *BRCA1* i *BRCA2* en pacients amb sospita de síndrome de càncer de mama i ovari hereditari. La identificació de mutacions en aquests pacients facilita l'assessorament genètic i l'aplicació de mesures de prevenció, detecció precoç i terapèutiques adequades.

Els objectius concrets d'aquest treball són:

- 1 Detectar i analitzar **mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2*** en els diversos individus a risc estudiats, per tal de:
 - Caracteritzar l'espectre de mutacions en la nostra població.
 - Avaluar la freqüència d'aquestes mutacions en el conjunt dels individus a risc, així com en diversos grups fenotípics.
 - Estudiar possibles associacions entre genotip i fenotip.
- 2 Identificar i establir l'origen i característiques de **mutacions recurrents** en la nostra població.
- 3 Establir la possible patogenicitat de les **variants d'efecte biològic desconegut** identificades durant el procés de detecció de mutacions, principalment per mitjà de l'anàlisi de l'RNA missatger de portadors.

MATERIAL I MÈTODES

1 CARACTERÍSTIQUES DE LA MOSTRA SELECCIONADA

A causa de la grandària dels gens *BRCA1* i *BRCA2* i al fet que les mutacions es troben distribuïdes al llarg de tota la seqüència, les tècniques de detecció de mutacions són molt laborioses i tenen un elevat cost econòmic. A més, aquests tipus d'estudis poden tenir conseqüències psicològiques pels individus analitzats i els seus familiars. Per aquests motius s'estableixen criteris estrictes de selecció de les famílies i pacients a estudiar, que indiquen una alta probabilitat de ser portador de mutació en *BRCA1* o *BRCA2* (vegeu introducció 5.1).

La mostra analitzada inclou 127 pacients (dones amb càncer de mama o d'ovari i homes amb càncer de mama) pertanyents a famílies estudiades a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Les famílies es distribueixen en tres grups:

Famílies amb casos de càncer de **mama i ovari**

≥3 casos : n = 30

2 casos : n = 9

Famílies amb casos de càncer de **mama**

≥3 casos : n = 53

2 casos : n = 25

Famílies amb casos de càncer de mama o d'ovari i càncer de **mama en homes** n = 10

Normalment s'ha analitzat el familiar amb la major probabilitat de ser portador d'una mutació patogènica en *BRCA1* o *BRCA2* : un home amb càncer de mama o la dona diagnosticada més jove de càncer de mama o d'ovari (preferentment d'ovari).

2 DETECCIÓ DE MUTACIONS GERMINALS EN *BRCA1* I *BRCA2*

Per a la detecció de mutacions s'han utilitzat dos dels mètodes més habituals en aquests tipus d'estudis: la PTT (*protein truncation test*) i la SSCP (*single strand conformation polymorphism*). Mentre que la PTT només detecta mutacions truncants i per tant presumptament patogèniques, la SSCP permet identificar també un gran nombre de variants al·lèliques que, en cas de no trobar-se en població control, són de difícil classificació. Així, s'han utilitzat diversos protocols addicionals per determinar la patogènica d'aquestes variants d'efecte biològic desconegut (apartat 4).

Tots els estudis s'han basat en l'anàlisi del material genètic (DNA i RNA) obtingut a partir de diversos tipus de teixits (principalment sang perifèrica) i seguint diferents protocols, tal com s'especifica en les publicacions. A continuació es resumeixen els protocols més significatius que s'han posat a punt i desenvolupat.

2.1 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE POLIMORFISMES DE CADENA SENZILLA (SSCP)

Amb la tècnica de SSCP, descrita per Orita *et al.* (1989), es poden detectar variacions en la seqüència d'un fragment de DNA prèviament amplificat mitjançant la tècnica de la Reacció en cadena de la polimerasa (PCR, de *polymerase chain reaction*). Aquest mètode es basa en el principi següent: quan un segment de DNA de doble cadena es desnatura mitjançant calor i posteriorment es refreda ràpidament, les cadenes queden separades. Si a continuació es sotmet a una electroforesi no desnaturalitzant en gel de poliacrilamida cada cadena de DNA pren una o vàries conformacions específiques (en funció de la seqüència de nucleòtids) condicionant la seva migració electroforètica. Una mínima variació de la seqüència pot manifestar-se per una diferència de conformació originant, com a conseqüència, una migració diferent.

El cribratge mutacional d'ambdós gens s'ha dut a terme mitjançant pels exons petits i de PTT pels exons grans (exó 11 de *BRCA1* i exons 10 i 11 de *BRCA2*) (figura 13). En la figura s'indiquen també els fragments en els que s'han dividit els exons per a la tècnica de PTT.

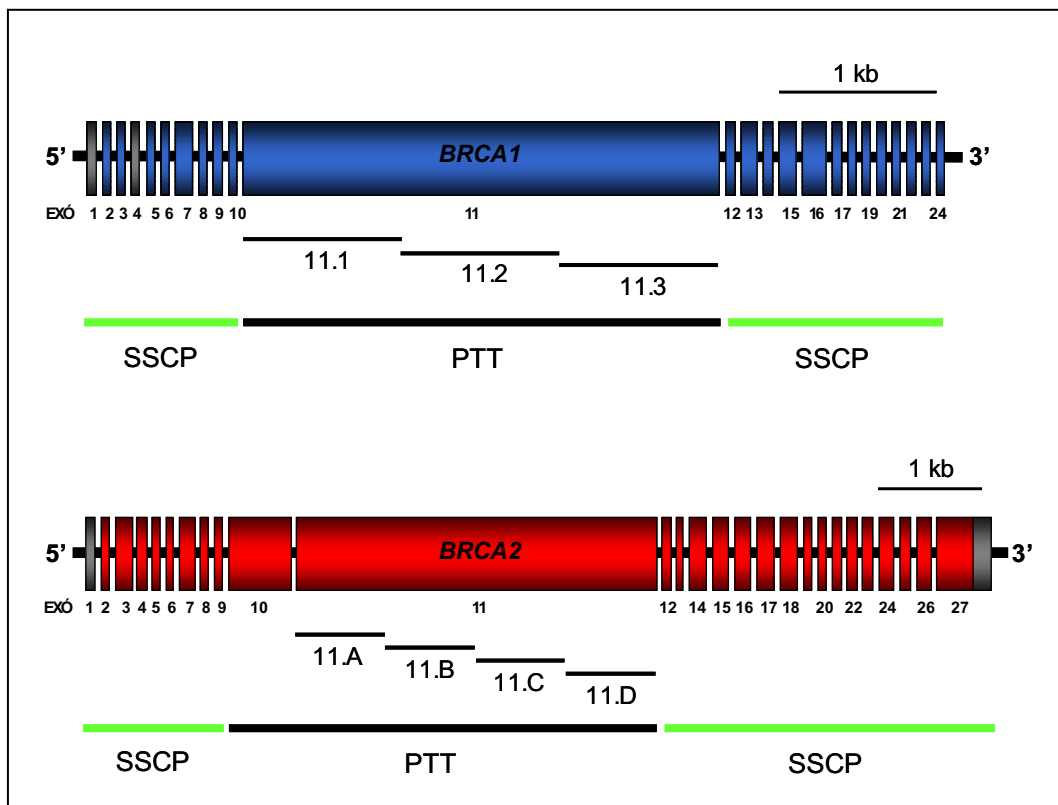


Figura 13 Representació esquemàtica dels fragments de *BRCA1* i *BRCA2* analitzats mitjançant SSCP i PTT.

La conformació i la mobilitat de la cadena ve determinada per paràmetres com la mida del fragment (major sensibilitat per mides petites), la composició del gel, la resistència iònica del tampó i la temperatura. Per augmentar la sensibilitat de la tècnica es recomana sotmetre a electroforesi a dues o més condicions adequades. L'electroforesi pot realitzar-se manual o automatitzada, com el sistema GeneGel (Amersham- Pharmacia Biotech) descrit en l'apartat 1.1 de Resultats.

2.2 ANÀLISI DE LA PROTEÏNA TRUNCADA (PTT)

Hi ha descrits diversos protocols per a la identificació de petites substitucions, insercions o delecions en fragments relativament petits de DNA (50-500 pb). Malgrat tot, quan es treballa amb gens grans com són *BRCA1* i *BRCA2*, és preferible analitzar fragments més grans per tal d'agilitar el procés. Un dels mètodes que ho permet és l'anàlisi de la proteïna truncada o PTT, una síntesi proteica *in vitro* que únicament detecta mutacions del tipus truncant, les més comunes en el càncer de mama hereditari. Quan s'analitza DNA genòmic, els fragments a analitzar no poden contenir regions intròniques.

Per *BRCA1*, s'estudia l'exó 11 dividit en 3 fragments i per *BRCA2*, l'exó 10 sencer i l'exó 11 dividit en 4 fragments (figura 13). S'amplifiquen per PCR els diferents fragments dels gens i posteriorment es realitza una reacció de transcripció i traducció *in vitro*. L'equip de reactius *TnT T7-Coupled Rabbit Reticulocyte System* de Promega conté els reactius necessaris per dur a terme la síntesi proteica.

S'utilitza un *primer forward* que conté tres regions específiques: un promotor de la RNA polimerasa del bacteriòfag T7, una seqüència d'inici de traducció (8 pb de la seqüència Kozac) i un triplet ATG en el marc de lectura. A més, el tub de reacció conté la TnT T7 RNA polimerasa i un lisat cel·lular de reticulòcits de conill que aporta la maquinària cel·lular de síntesi proteica i aminoàcids. També s'afegeix ³⁵S-metionina que s'incorpora als fragments proteics i permet, després d'una electroforesi (SDS-PAGE), visualitzar per autoradiografia les bandes corresponents als diversos fragments proteics. Les bandes amb moviment anormal indiquen fragments de longitud anòmala, deguts a l'existència d'una mutació.

3 CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS RECURRENTS: ANÀLISI DE L'HAPLOTIP

L'anàlisi de l'haplotip associat a mutacions que apareixen de forma recurrent en diverses famílies, permet establir un possible origen comú.

Per a la caracterització de les mutacions recurrents 330A>G en *BRCA1* i 9254del5 i 6857delAA en *BRCA2*, s'ha construït l'haplotip dels cromosomes 17 i 13, on es localitzen *BRCA1* i *BRCA2*, respectivament, mitjançant l'anàlisi de **seqüències microsatèl·lits** (repeticions **CA**) altament polimòrfiques (figura 14). Per construir

l'haplotip de *BRCA2* s'han estudiat també dos polimorfismes interns, analitzats per SSCP: 1342A>C (exó 10) i 7470A>G (exó 14).

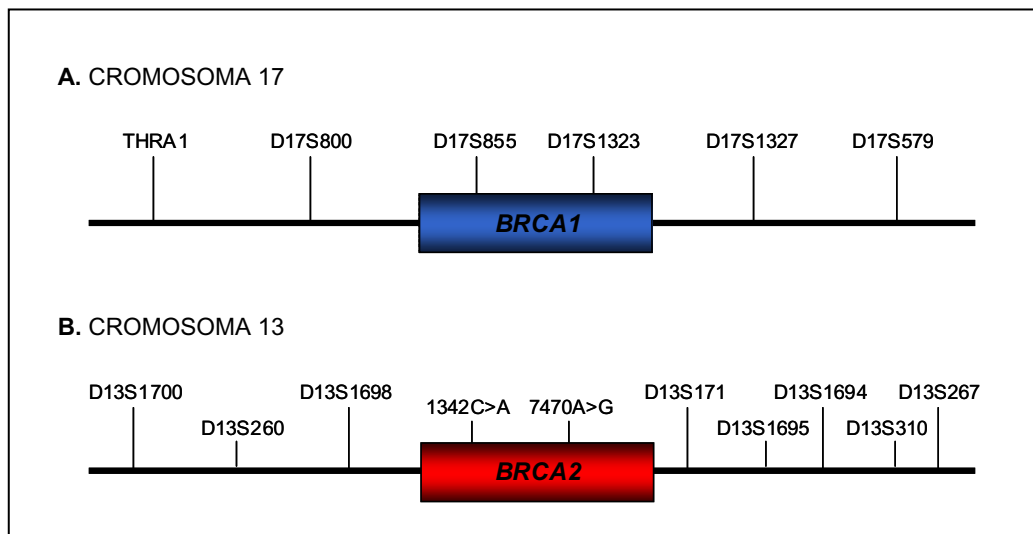


Figura 14 Representació esquemàtica dels marcadors microsatèl·lits analitzats en *BRCA1* (A) i *BRCA2* (B). També es mostren dos polimorfismes interns en el gen *BRCA2*, utilitzats també per a la construcció de l'haplotip del cromosoma 13.

El DNA de sang perifèrica del màxim nombre d'individus de cada família, tant portadors com no portadors, s'amplifica mitjançant **PCR** per cada un dels marcadors. Seguidament es procedeix a la detecció de les bandes, mitjançant el mètode d'**ECL** (**Enhanced Chemiluminescence**) (Amersham), que utilitza una sonda (CA)_n que ha sigut marcada en l'extrem 5' amb una biotina.

El producte de PCR es dilueix amb blau de formamida, segons la intensitat de l'amplificació. Es desnatura a 5 min a 95 °C i es posen les mostres en gel. Es carreguen 3 µl del producte en un gel desnatura a 8% en condicions desnatura i es realitza l'**electroforesi** a 1800V. El temps de carrera depèn de la mida dels fragments.

Els fragments es **transfereixen** a una membrana de **niló** (carregada positivament) que s'humiteja en SSC2X durant 10-15 min i s'introdueix en un tub d'hibridació. S'afegeixen 30 ml del tampó d'hibridació (*Gold Buffer*) i es procedeix a una **prehibridació** a 42 °C durant un mínim de 30 min. Per a la **hibridació** s'afegeixen 15 µl de la sonda marcada i 3 µl de peroxidasa i es deixa a 42 °C durant un mínim de 1 h. En el mateix tub d'hibridació, es fan dos **rentats** amb la solució de rentat (SSC3X + SDS 0,1%) prèviament escalfada a 42 °C. La membrana es submergeix en els reactius de detecció del *kit* durant un minut exacte. Finalment, s'asseca i es procedeix al seu **revelat** en una placa radiosensible.

Les **frequències** dels diferents al·lels de cada marcador i dels dos polimorfismes de *BRCA2* es calculen a partir de **100 cromosomes** de població espanyola sana, no portadors de la mutació. Per a cada família s'obté un **haplotip** associat a la mutació i els haplotips obtinguts es comparen per tal de determinar si la mutació té o no un origen comú.

4 ESTUDI DE VARIANTS D'EFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT

Hi ha diverses estratègies per tal d'esbrinar si un canvi en la seqüència nucleotídica del gen pot realment afectar l'estructura o la funció de la proteïna corresponent (vegeu Introducció 2.6). L'estudi del mRNA de portadors de mutacions permet identificar els possibles canvis en la maduració del pre-mRNA causats per variants al·lèliques. Si el processament del RNA és normal i es disposa de teixit tumoral dels portadors, es pot estudiar la possible pèrdua al·lèlica en la regió del gen.

4.1 ANÀLISI DE L'RNA DE PORTADORS

La major part dels gens eucariotes que codifiquen per proteïnes contenen la seqüència traduïble en segments discontinus (**exons**), interromputs per altres seqüències generalment més llargues (**introns**), que no formen part del RNA madur. Els introns són eliminats del transcrit primari mitjançant un procés bioquímic conegut com **splicing**, que té lloc d'una manera exacta i precisa en els **llocs de tall** o *splice sites*. El procés d'*splicing* es duu a terme per l'**spliceosoma**, un gran complex macromolecular format per ribonucleoproteïnes nuclears petites (**snRNPs**) i més de 60 **factors d'*splicing*** addicionals, que s'uneix a unes **seqüències conservades** i catalitza el procés.

La selecció dels extrems de l'intró o llocs d'*splicing* és bàsica per la fidelitat i efectivitat del procés i ve determinada pel lloc d'*splicing* **5'** o **donador**, la seqüència de **punt ramificat** (*branch site*) i el lloc d'*splicing* **3'** o **acceptor** del pre-mRNA. L'alteració d'aquestes seqüències (gairebé idèntiques a tots els introns coneguts) pot afectar greument el procés de maduració del transcrit i generar mRNAs anormals, que són inestables o bé generen isoformes proteïques defectuoses o deletèries.

A més, s'han descrit diversos **elements en cis**, importants per una correcta identificació dels llocs d'*splicing*. Aquests elements poden actuar bé estimulants (com els *enhancers*) o reprimint (com els *silencers*) l'*splicing*. Les **seqüències potenciadores de l'*splicing*** (*Exonic Splicing Enhancer*, **ESE**), en particular, semblen ser abundants i estar presents en la majoria dels exons. Són llocs d'unió de **proteïnes SR** (riques en serina i arginina) i actuen afavorint la inclusió dels exons en el mRNA madur. Un estudi recent, realitzat a partir d'una base de dades de 50 substitucions d'un únic nucleòtid que causen la deleció d'un exó (*exon skipping*) *in vivo* en diversos gens humans, mostra que sovint, però no sempre, l'*exon skipping* aberrant és el resultat del trencament d'una ESE crítica (Liu *et al.*, 2001). Petites insercions o delecions en els exons podrien tenir efectes similars.

Obtenció de cDNA: RT-PCR

L'RNA total s'aïlla de limfòcits de sang perifèrica d'individus portadors i de controls utilitzant el reactiu d'extracció de RNA UltraspecTM (Biotecx) i, posteriorment, l'RNA total (5 µl) es retrotranscriu a cDNA utilitzant la *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (Life Technologies).

Dos µl del producte de la RT-PCR i 20 pmol de cada *primer* s'amplifiquen en una reacció de 50 µl que conté 1.0 U de polimerasa de DNA (EcoTaq, Ecogen SRL), 20 nmol de cada desoxiribonucleòtid trifosfat, tampó de reacció (Ecogen SRL), i 1,5 mmol/l de MgCl₂ (1,25 mmol/l en el cas de l'amplicó 20-24 de BRCA2). L'amplificació es duu a terme en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA).

S'utilitza una PCR "touchdown", que consisteix en uns primers 20 cicles de 94°C 40 segons, 60°C 40 segons menys 0,5°C per cicle, seguits de 20 cicles més de 94°C 40 segons, 50°C 40 segons més un segon per cicle. La mida dels productes de la PCR es verifica en un gel d'agarosa al 2%.

Seqüenciació

Tots els amplicons es seqüencien utilitzant un aparell ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Els *primers* utilitzats es troben a l'interior d'exons que flanquegen la regió amb el canvi en la seqüència a estudiar. Si una mutació provoca un *splicing* anormal, en el gel d'agarosa apareix una banda d'una mida diferent i la seqüenciació del cDNA permet conèixer les característiques del canvi.

4.2 AVALUACIÓ TEÒRICA D'ALTERACIONS EN L'*SPLICING*

Existeixen diversos mètodes que permeten predir, a partir d'una seqüència de DNA, si una variant pot causar un *splicing* aberrant. La comparació d'aquestes prediccions amb l'anàlisi del mRNA és útil per confirmar la seva validesa.

Seqüències consens

Les reaccions de ruptura i acoblament s'han de realitzar amb gran precisió, ja que un error en un sol nucleòtid podria fer variar el marc de lectura de la seqüència del mRNA resultant, produint-se un missatge sense sentit. En la gran majoria d'introns, els primers dos nucleòtids de la seqüència intrònica són **5'-GU-3'** i els dos últims, **5'-AG-3'**. Els motius GU-AG formen part d'unes seqüències conservades més llargues que es troben al voltant dels llocs 5' i 3' d'*splicing*. Aquestes seqüències varien en els diferents tipus d'eucariotes; en els vertebrats es poden descriure com:

Lloc donador d'*splicing* (5') 5' - AG↓GUAAGU - 3'
Lloc acceptor d'*splicing* (3') 5' - PyPyPyPyPyPyNCAG↓ - 3'

on "Py" és un dels dos nucleòtids pirimidina (U o C), "N" és qualsevol nucleòtid, i la fletxa indica la frontera exó-intró.

El primer mètode es basa en el càlcul dels **valors consens**, que reflecteixen la similitud entre un lloc d'*splicing* amb la variant i les seqüències conservades dels **llocs donador i acceptor d'*splicing*** (Shapiro i Senapathy, 1987).

S'estudien tres variants en zones intròniques de *BRCA1*: IVS18+5G>A, IVS20-6_IVS20-4del i IVS22-2A>G. Per cada una es compara el valor consens de la

seqüència salvatge amb el de la mutada. Aquest valor hauria de ser inferior en cas que la variant trenqui la seqüència consens i provoqui un *splicing* anòmal.

Seqüències ESE: ESEfinder

Aquest mètode permet estudiar l'efecte de variants localitzades en exons. L'ESEfinder (Cartegni *et al.*, 2002a i 2003) (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE>) (abans <http://exon.cshl.edu/ESE/>) és un programa que facilita l'anàlisi ràpida de seqüències exòniques per identificar possibles seqüències ESE d'unió a quatre proteïnes SR: SF2/ASF, SC35, SRp40 i SRp55 (figura 15).

Les seqüències ESE de cada proteïna presenten una composició nucleotídica particular (figura 15A). El programa analitza la similitud entre aquestes seqüències consens i qualsevol fragment de DNA proporcionant un valor (*score*). Si aquest supera el valor llindar (*Thr*) establert per cada proteïna, indica que es pot tractar d'una ESE (figura 15B).

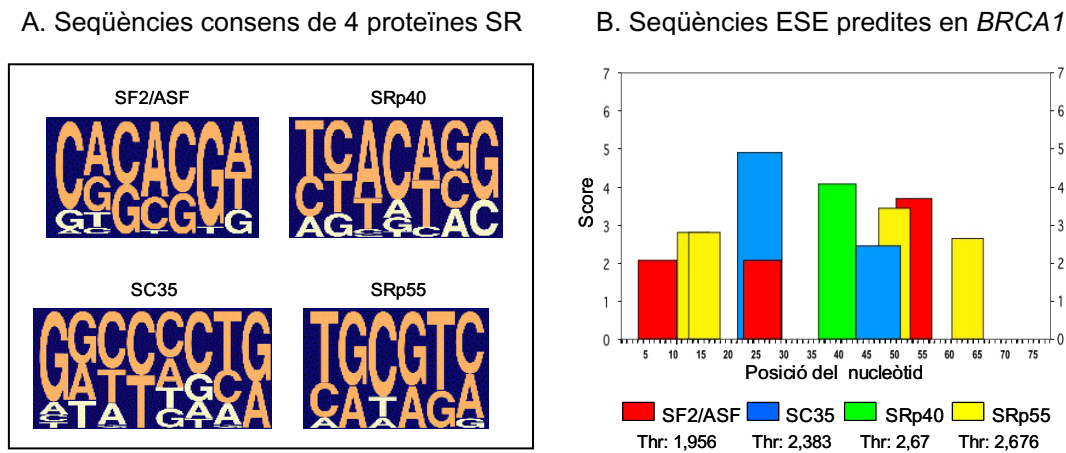


Figura 15 Seqüències ESE d'unió a proteïnes SR. **A.** Seqüències consens d'unió a quatre proteïnes SR. L'altura de cada lletra representa la freqüència de cada nucleòtid en una posició donada. **B.** Representació de les 9 ESE predites en la seqüència que correspon als nucleòtids 1-78 de BRCA1. L'amplada de les barres representa la longitud del motiu (6, 7 o 8 nucleòtids). L'altura de les barres representa el valor (*score*) del motiu. En la gràfica apareixen només els valors més alts. Tret de la web de l'ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE>).

El patró d'ESEs de la seqüència amb la variant es compara amb el de la seqüència salvatge, per tal d'identificar qualsevol guany o pèrdua de llocs d'unió de SR predits. En el present treball (Resultats 3), s'han comparat les seqüències de cDNA de l'exó 18 de BRCA1 per estudiar l'efecte de les variants 5196del3, G1706A i S1715N, i la de l'exó 15 de BRCA2 per estudiar la variant T2515I.

4.3 DETECCIÓ DE PÈRDUA AL·LÈLICA MITJANÇANT L'ANÀLISI DE MARCADORS MICROSATÈL·LITS

La pèrdua al·lèlica, o pèrdua d'heterozigositat, s'associa a la pèrdua del gen salvatge en tumors amb una mutació en un gen supressor. Aquest fenomen és molt habitual en tumors de mama i d'ovari en pacients portadors d'al·lels mutats, en què s'observen pèrdues al·lèliques de regions cromosòmiques que contenen *BRCA1* o *BRCA2*. La pèrdua de l'al·lel salvatge en el tumor d'un portador d'una variant d'efecte biològic desconegut, afavoreix la hipòtesi del caràcter patogènic de la variant.

A partir de mostres de DNA de sang perifèrica de diversos individus de la mateixa família es construeix l'haplotip amb marcadors microsatèl·lits, tal i com s'ha explicat en l'apartat 3, i s'identifica l'haplotip associat a la mutació.

Per una altra banda, s'extreu el DNA dels tumors, en aquest cas parafinats, utilitzant l'equip DEXPAT™ (TaKaRa Biomedicals), i es procedeix també a la construcció de l'haplotip.

Es compara l'haplotip del DNA de sang perifèrica amb el de DNA dels tumors i es comprova si hi ha hagut pèrdua d'heterozigositat en algun dels marcadors i si correspon a l'al·lel salvatge.

RESULTATS

1 DETECCIÓ DE MUTACIONS EN ELS GENS *BRCA1* I *BRCA2*

1.1 CONDITIONS FOR SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) ANALYSIS IN *BRCA1* GENE IN AN AUTOMATED SYSTEM

B Campos, O Díez, J Cortés, M Domènech, C Alonso, M Baiget

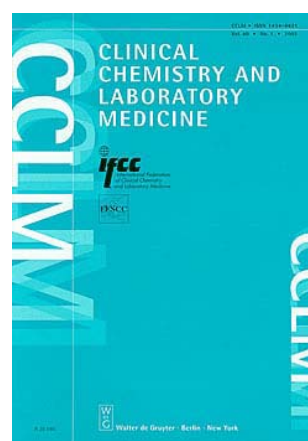
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2001; 39: 401-404

El desenvolupament de mètodes automatitzats per a la detecció de mutacions puntuals en gens de grans dimensions implicats en diverses malalties hereditàries és d'elevada importància per tal d'oferir un diagnòstic en el menor temps possible.

En aquest treball hem avaluat la influència de diversos paràmetres en la sensibilitat d'un mètode de SSCP automatitzat (GenePhor System; Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), per a la detecció de mutacions en el gen *BRCA1*: temperatura i temps d'electroforesi, concentracions de DNA i d'encebadors (*primers*), refredament de la mostra després de la seva desnaturalització i, finalment, el tipus de mutació i la seva posició en el fragment.

La temperatura d'electroforesi més idònia ha resultat ser la de 5°C, comparat amb la de 20°C. Malgrat que s'han obtingut patrons de mobilitat molt semblants amb els tres temps d'electroforesi provats (1h 30min, 2h 15min i 3h), el temps de 2h 15min ha estat el que ha permès detectar el major nombre de mutacions. D'altra banda, les concentracions de DNA i de *primers* no afecten el patró de SSCP i hem comprovat que després de la desnaturalització de les mostres cal un refredament en gel, contràriament al suggerit per altres autors. Els canvis en la mobilitat no depenen del tipus de mutació però solen ser més evidents en les insercions i delecions que en les substitucions.

Així, hem establert les condicions òptimes per obtenir una major sensibilitat en la detecció de mutacions en *BRCA1* mitjançant aquest mètode de SSCP automatitzat, aplicables també a l'anàlisi d'altres gens.



1.2 BRCA2 MUTATION ANALYSIS OF 87 SPANISH BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES

B Campos, O Díez, M Domènech, M Baena, C. Pericay, E del Río, J Balmaña, C Alonso, M Baiget

Annals of Oncology 2001; 12:1699-1703

En aquest treball hem analitzat el gen *BRCA2* en 87 famílies espanyoles amb càncer de mama i ovari, sense mutació identificada en *BRCA1*, per tal de caracteritzar la prevalença i l'espectre de mutacions en *BRCA2*.

Els primers estudis sobre la freqüència de mutacions en *BRCA2*, van trobar que entre el 25% i el 35% de les famílies amb càncer de mama (i sense càncer d'ovari) presentaven mutacions en aquest gen, però treballs més recents mostren que segurament aquests percentatges estan sobreestimats i depenen de la població estudiada.

Els nostres resultats, de 15 (17,2%) mutacions patogèniques detectades, reforcen la possibilitat que algunes d'aquestes famílies tinguin mutacions en altres gens, a part de *BRCA1* i *BRCA2*, que confereixen riscos inferiors a desenvolupar càncer de mama.



2 CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS RECURRENENTS

2.1 THE R71G BRCA1 IS A FOUNDER SPANISH MUTATION AND LEADS TO ABERRANT SPLICING OF THE TRANSCRIPT

A Vega*, B Campos*, B Bressac de Paillerets, PM Bond, N Janin, FS Douglas, M Domènech, M Baena, C Pericay, C Alonso, A Carracedo, M Baiget, O Díez

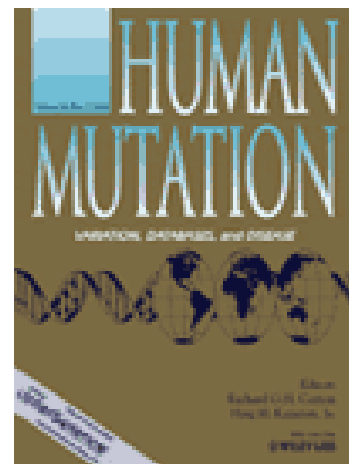
*Aquests autors han contribuït en la mateixa mesura al treball

Human Mutation 2001; 17:520-521

En individus amb càncer de mama estudiats a diversos centres d'Espanya, Gran Bretanya i França es va identificar la mutació *BRCA1* 330A>G en sis famílies no relacionades, la majoria d'origen gallec.

Aparentment, el canvi A>G en el nucleòtid 330 provoca la substitució d'una arginina per una glicina en el codó 71 (R71G), essent aquesta una variant *missense* d'efecte biològic desconegut. En canvi, la posició 330 coincideix amb la posició -2 del lloc donador d'*splicing* de l'exó 5 i l'anàlisi de la seqüència del cDNA va mostrar la deleció de 22 pb de l'exó 5, creant, juntament amb les primeres bases de l'exó 6, un codó de terminació en la posició 64, que resulta en una proteïna truncada. Així, aquests resultats suggereixen que la variant *BRCA1* 330A>G és una mutació clarament patològica.

D'altra banda, per esbrinar si la mutació tenia un origen comú en les sis famílies, es va construir l'haplotip mitjançant l'anàlisi de sis microsatèl·lits situats dins o prop de *BRCA1*: cen-THRA1, D17S800, D17S855, D17S1323, D17S1327 i D17S579 -tel. Els nostres resultats són consistents amb la possibilitat que aquestes famílies compartissin un avantpassat comú, essent *BRCA1* 330A>G una mutació fundadora probablement d'origen gallec.



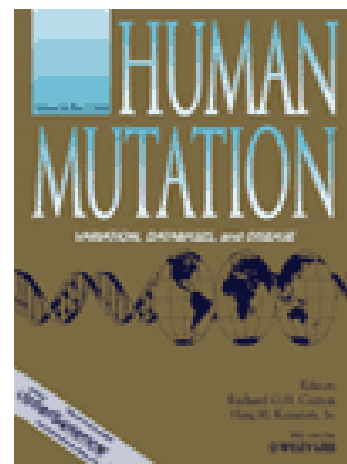
2.2 HAPLOTYPE ANALYSIS OF THE *BRCA2* 9254delATCAT RECURRENT MUTATION IN BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES ORIGINATED FROM SPAIN

B Campos, O Díez, F Odefrey, M Domènech, V Moncoutier, JI Martínez-Ferrandis, A Osorio, J Balmaña, A Barroso, ME Armengod, J Benítez, C Alonso, D Stoppa-Lyonnet, D Goldgar, M Baiget

Human Mutation 2003; 21:452

En aquest treball hem analitzat l'haplotip associat a la mutació *BRCA2* 9254del5, que va ser identificada independentment en 12 famílies amb càncer de mama i ovari, 11 d'elles d'origen espanyol. L'haplotip s'ha construït a partir de l'estudi de vuit marcadors microsatèl·lits, que es distribueixen al llarg d'una regió de 6,1 cM: cen-D13S1700, D13260, D13S1698, (*BRCA2*), D13S171, D13S695, D13S1694, D13S310 i D13S267-tel, i de dos polimorfismes en el gen *BRCA2*: 1342A>C i 7470A>G.

Els nostres resultats suggereixen que *BRCA2* 9254del5 és una mutació fundadora originada a l'àrea mediterrània de la Península Ibèrica, amb una edat estimada de 92 (95% CI, 56-141) generacions.



2.3 ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO EN PORTADORES DE LA MUTACIÓN 6857delAA EN EL GEN BRCA2 EN 4 FAMILIAS CON CÁNCER DE MAMA/OVARIO HEREDITARIO

B Campos, O Díez, C Álvarez, L Palma, M Domènech, J Balmaña, J Sanz, A Ramírez, C Alonso, P Carvallo, M Baiget

Medicina Clínica 2004; 123:543-545

En aquest treball hem estudiat la mutació *BRCA2* 6857delAA, que va ser identificada en tres famílies espanyoles i una xilena, totes elles amb avantpassats a Catalunya.

L'anàlisi de l'haplotip en els portadors s'ha realitzat per mitjà de l'estudi de cinc marcadors microsatèl·lits que flanquegen el gen i que s'estenen en una regió de 6 cM: cen-D13260, D13S1698, (*BRCA2*), D13S171, D13S310 i D13S267-tel.

Els resultats mostren un mateix haplotip i suggereixen l'existència d'un avantpassat comú amb la mutació, originada a l'àrea de Catalunya. Tenint en compte els moviments migratoris des d'Espanya a Llatinoamèrica, la recerca en aquests països de mutacions aparegudes a Espanya pot afavorir una anàlisi dels gens *BRCA* més racional, efectiva i de menor cost.

MEDICINA CLINICA	
Volúmen 114 - Suplemento 3 - 2004	
Investigación de resultados en salud -Outcomes research-	
Estilos médicos A. Balbuena y J. del Canto	
Investigación de resultados en salud	Desarrollo del cuestionario clínico ECOS 16 para la medición de la calidad de vida en pacientes con antecedente de cáncer
A. Balbuena y J. del Canto	A. Balbuena, C. Pineda, M. Ariza y J. del Canto
Desarrollo reciente de la evaluación económica en salud	6
J. Ariza	
Integración de costes indirectos en la evaluación económica	Evaluación de la calidad de vida relacionada con la salud en el estudio de calidad de vida en el cáncer de mama
J. Ariza	A. Balbuena, C. Pineda, M. Ariza y J. del Canto
Método de la calidad de vida relacionada con la salud	10
J. Ariza	
La identificación del paciente como una medida del resultado de la atención sanitaria	12
J. Ariza y J. del Canto	
Medicina costo-efectiva y medicina basada en la evidencia en el estudio de prevención de enfermedades crónicas	14
J. Ariza y J. del Canto	
Establecimiento de una base de datos para estudios de resultados sobre la atención sanitaria	16
J. Ariza y J. del Canto	
Impacto económico de los efectos secundarios gastrointestinales asociados a antineoplásicos en el estudio de prevención de enfermedades crónicas	18
J. Ariza y J. del Canto	
Intoxicación y toxicología como profetas apocalípticos en cirugía cardíaca: estudio farmacocinético de ceftriaxona en el niño	20
J. Ariza y J. del Canto	
Análisis costo-efectividad del tratamiento antituberculoso de alta potencia en pacientes VIH-sidosos	22
J. Ariza y J. del Canto	
Desarrollo del cuestionario clínico ECOS 16 para la medición de la calidad de vida en pacientes con antecedente de cáncer	24
A. Balbuena, C. Pineda, M. Ariza y J. del Canto	
Evaluación de la calidad de vida relacionada con la salud en el estudio de calidad de vida en el cáncer de mama	26
A. Balbuena, C. Pineda, M. Ariza y J. del Canto	
Identificación del paciente como una medida del resultado de la atención sanitaria	28
J. Ariza y J. del Canto	
Medicina costo-efectiva y medicina basada en la evidencia en el estudio de prevención de enfermedades crónicas	30
J. Ariza y J. del Canto	
Establecimiento de una base de datos para estudios de resultados sobre la atención sanitaria	32
J. Ariza y J. del Canto	
Impacto económico de los efectos secundarios gastrointestinales asociados a antineoplásicos en el estudio de prevención de enfermedades crónicas	34
J. Ariza y J. del Canto	
Intoxicación y toxicología como profetas apocalípticos en cirugía cardíaca: estudio farmacocinético de ceftriaxona en el niño	36
J. Ariza y J. del Canto	
Análisis costo-efectividad del tratamiento antituberculoso de alta potencia en pacientes VIH-sidosos	38
J. Ariza y J. del Canto	

3 ESTUDI DE VARIANTS D'EFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT

RNA ANALYSIS OF EIGHT *BRCA1* AND *BRCA2* UNCLASSIFIED VARIANTS IDENTIFIED IN BREAST/OVARIAN CANCER FAMILIES FROM SPAIN

B Campos, O Díez, M Domènech, M Baena, J Balmaña, J Sanz, A Ramírez, C Alonso, M Baiget

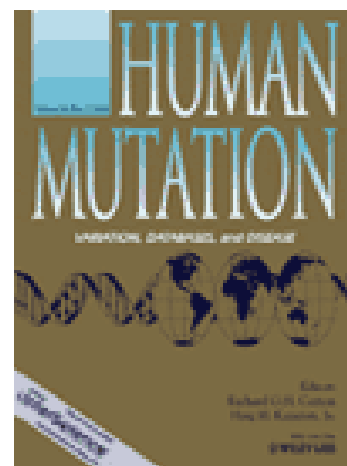
Human Mutation 2003; 22:337

Mutacions germinals en els gens de susceptibilitat al càncer de mama *BRCA1* i *BRCA2* expliquen una gran proporció de les famílies amb càncer de mama i ovari hereditari. A part de les mutacions clarament patogèniques, que són aquelles que provoquen la síntesi d'una proteïna truncada o mutacions *missense* que afecten dominis funcionals coneguts, en el procés d'anàlisi dels gens s'identifiquen diverses variants amb un efecte biològic desconegut. La caracterització d'aquestes variants "no classificades" és essencial a l'hora d'oferir un consell genètic eficient a les famílies.

En aquest treball hem analitzat, per RT-PCR, quatre variants intròniques i quatre d'exòniques susceptibles d'afectar el procés d'*splicing*.

Els resultats mostren un *splicing* aberrant en tres variants, totes en el gen *BRCA1*: 5196del3 (Ala1693del), IVS18+5G>A i IVS22-2G>A. En canvi, les variants 5236G>C (G1706A), 5263G>A (S1715N) i IVS20-6_IVS20-4del en *BRCA1*, i 7772C>T (T2515I) i IVS25+9A>G en *BRCA2*, produeixen transcrits madurs normals.

Aquests resultats no són totalment coincidents amb els obtinguts mitjançant dos mètodes teòrics per predir possibles alteracions en l'*splicing*. Per tant, recomanem realitzar l'estudi de l'RNA sempre que sigui possible.



ANNEX DE RESULTATS

ANALYSIS OF BRCA1 AND BRCA2 GENES IN SPANISH BREAST/OVARIAN CANCER PATIENTS: A HIGH PROPORTION OF MUTATIONS UNIQUE TO SPAIN AND EVIDENCE OF FOUNDER EFFECT

O Díez, A Osorio, M Durán, JI Martínez-Ferrandis, M de la Hoya, R Salazar, A Vega, B Campos, R Rodríguez-López, E Velasco, J Chaves, E Díaz-Rubio, JJ Cruz, M Torres, E Esteban, A Cervantes, C Alonso, JM San Román, R González-Sarmiento, C Miner, A Carracedo, ME Armengod, T Caldés, J Benítez, M Baiget

Human Mutation 2003; 22:301-312

En aquest treball es presenten els resultats d'un estudi fet en col·laboració en set centres del país: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona); Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Madrid); Instituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid; Instituto de Investigaciones Citológicas FVIB - Hospital Clínico Universitario, Universidad de Valencia; Hospital Clínico San Carlos (Madrid); Centro de Investigación del Cáncer - Universidad de Salamanca; Hospital de Conxo - Universidad de Santiago de Compostela; Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela.

Es recullen les dades obtingudes de l'anàlisi molecular dels gens *BRCA1* i *BRCA2* dels casos índex de 410 famílies espanyoles amb característiques de càncer de mama i ovari hereditari i de 214 pacients amb càncer de mama sense antecedents familiars, 19 d'ells homes. Es van utilitzar diverses tècniques, segons la disponibilitat de cada centre: SSCP, PTT, CSGE, DGGE i seqüenciació directa.

Es van identificar 60 individus amb mutacions clarament patogèniques en el gen *BRCA1* i 53, en *BRCA2*. Onze de les 53 mutacions diferents detectades són noves i 12 només havien estat descrites en famílies espanyoles (segons el BIC). Les mutacions 185delAG, 330A>G, G1706E, A1708E i 589delCT representen el 46,6% de les mutacions deletèries detectades en *BRCA1* mentre que 3036del4, 6857delAA, 9254del5 i 9538delAA representen el 56,6% de les mutacions en *BRCA2*.

En la sèrie de 410 famílies, la freqüència total de mutacions va ser de 26,3%. La major proporció de mutacions es va trobar en les famílies amb casos de càncer de mama i d'ovari (52,1%). La menor proporció de mutacions es va trobar en el grup de famílies amb només càncer de mama en dones (15,4%). De les famílies amb càncer de mama en homes, el 59,1% presentaven mutació en el gen *BRCA2*.

Es va trobar una freqüència més elevada de càncer d'ovari associada a mutacions en l'extrem 5' del gen *BRCA1*, però no hi havia associació entre la prevalença d'aquest tipus de càncer i mutacions situades en la regió del gen *BRCA2* coneguda com l'OCCR (*ovarian cancer cluster region*).



DISCUSSIÓ

1 ANÀLISI DE MUTACIONS EN ELS GENS *BRCA1* I *BRCA2*

A continuació es comenten els resultats obtinguts de l'anàlisi molecular dels gens *BRCA1* i *BRCA2* en 127 famílies ateses a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (SP) i publicats en diversos articles (un dels quals reuneix les dades de 410 famílies espanyoles amb CMOH, estudiades en diferents centres). Si bé la discussió es basa principalment en les dades de la nostra sèrie, es consideren també les freqüències obtingudes en l'estudi multicèntric.

1.1 MUTACIONS IDENTIFICADES EN *BRCA1* I *BRCA2*

Entre les 127 famílies seleccionades i analitzades com s'ha descrit anteriorment (Material i mètodes 1 i 2), es van identificar diferents tipus de variants al·lèliques: mutacions clarament patogèniques, variants d'efecte biològic desconegut (algunes de les quals s'han classificat recentment com a patogèniques gràcies a aquest i altres treballs) (discutit més extensament en l'apartat 3) i polimorfismes (Annex de resultats). Els nucleòtids s'han numerat prenent com a referència les seqüències del GenBank **U14680** per *BRCA1* i **U43746** per *BRCA2*. Les alteracions genètiques detectades s'han anomenat seguint la nomenclatura recomanada per Den Dunnen i Antonarakis (2000). Addicionalment, en alguns dels resultats publicats les mutacions es descriuen segons les recomanacions de la Human Genome Variation Society.

Mutacions identificades en el gen *BRCA1*

En la sèrie de SP, es van identificar **15 mutacions** diferents en el gen *BRCA1*, en **19 famílies** amb CMOH, i **5 variants** fins al moment no classificades (figura 16).

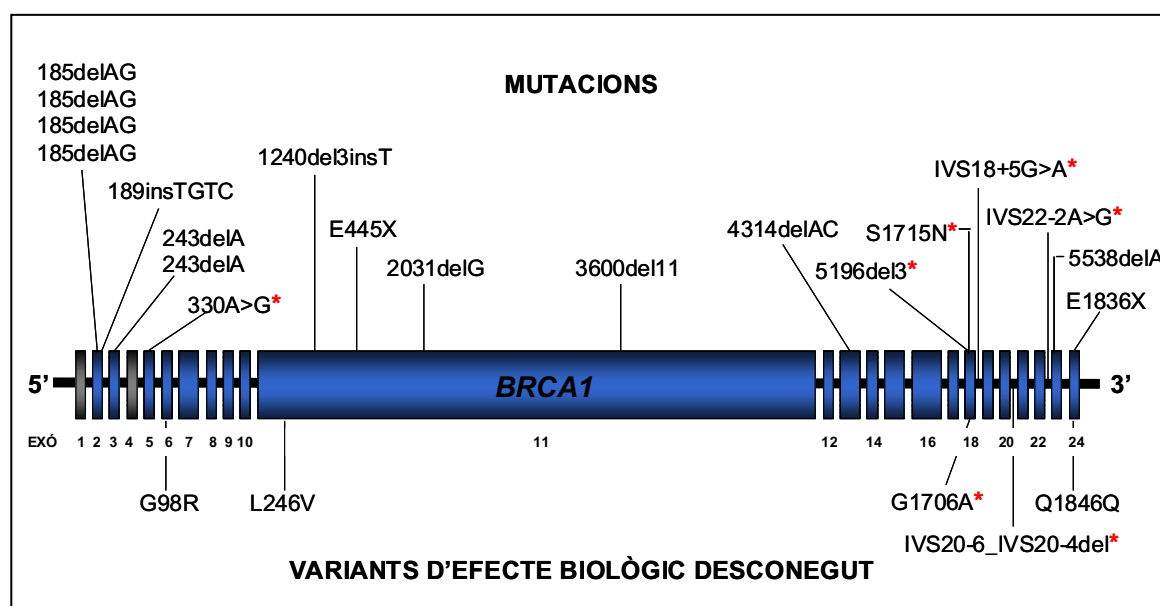


Figura 16 Mutacions i variants d'efecte biològic desconegut identificades en el gen *BRCA1*. Les seqüències traduïbles es representen en blau. Els asteriscs (en vermell) indiquen les variants el possible efecte biològic de les quals s'ha analitzat en aquest treball.

De les 15 mutacions identificades, 8 són petites insercions o delecions que trenquen el marc de lectura (*frameshift*) i 2 són canvis nucleotídics que provoquen l'aparició directa d'un codó de terminació (*nonsense*) (taula 11). Totes elles previsiblement causen l'aturada prematura de la transcripció. A més, s'han considerat com a mutacions patogèniques 4 variants al·lèliques que alteren l'*splicing* causant transcrits anormals i 1 mutació *missense* (S1715N) que presumptament afecta la funció normal de la proteïna BRCA1 (discutit més extensament en l'apartat 3).

La majoria de les mutacions només apareixen en una família. Algunes d'elles, però, s'han identificat en més famílies espanyoles o d'altres poblacions (BIC) (taula 11).

Taula 11 Mutacions identificades en el gen *BRCA1* i la seva presència en població espanyola i altres.

Mutació	Exó/intró	Tipus ¹	Sant Pau N	Multicèntric ² N ³	BIC (febrer 2006) N ³
185delAG	2	<i>fs</i>	4	6	1595
189insTGTC	2	<i>fs</i>	1	–	–
243delA	3	<i>fs</i>	2	–	–
330A>G	5	<i>sp</i>	1	6	19
1240del3insT	11	<i>fs</i>	1	–	3
E445X	11	<i>ns</i>	1	–	–
2031delG	11	<i>fs</i>	1	1	1
3600del11	11	<i>fs</i>	1	–	35
4314delAC	13	<i>fs</i>	1	–	2
5196del3	18	<i>sp</i>	1	–	1
S1715N	18	<i>ms</i>	1	–	3
IVS18+5G>A	IVS18	<i>sp</i>	1	–	–
IVS22-2A>G	IVS22	<i>sp</i>	1	–	–
5538delA	23	<i>fs</i>	1	–	1
E1836X	24	<i>ns</i>	1	–	–

N : nº de famílies en les que s'ha identificat la mutació; guió (–) : no identificada.

¹ Tipus de mutació: *fs* = *frameshift*, *ms* = *missense*, *ns*: *nonsense*, *sp* = *splicing*;

² Annex de Resultats; ³ No s'inclouen les mutacions detectades a SP.

L'alteració més freqüent en *BRCA1* va ser la mutació d'origen jueu 185delAG, detectada en quatre famílies, dues d'elles d'ètnia gitana. A part d'aquesta, l'única mutació en *BRCA1* trobada en més d'una família va ser la 243delA, identificada dues vegades. Les altres 13 mutacions només s'han detectat una sola vegada en la nostra sèrie, encara que algunes d'elles han estat identificades en altres famílies espanyoles o d'altres poblacions (taula 11). Un exemple és la mutació 330A>G, identificada en una família catalana d'origen gallec i a la resta d'Espanya en sis famílies més, la majoria també d'origen gallec.

Pel que fa a seva localització en el gen, les mutacions es troben distribuïdes al llarg de tota la seqüència (figura 16). En la regió 5' de *BRCA1* (exons 2, 3, 5-10), a part de les tres mutacions recurrents descrites, es va identificar la mutació 189insTGTC, en una única família.

En l'exó 11, es van detectar quatre mutacions que previsiblement causen l'aturada prematura de la transcripció: tres delecions i una mutació de tipus *nonsense*. La mutació 2031delG no s'ha identificat en altres poblacions a part de l'espanyola i la mutació E445X (1452G>T), descrita per primera vegada en el nostre estudi, es va trobar posteriorment en una altra família espanyola. La mutació 1240delinsT apareix en tres famílies en el BIC (una d'elles catalana i una altra francesa) i és una mutació complexa, consistent en una combinació d'una delecio i una inserció. La delecio d'onze nucleòtids 3600del11 no s'ha trobat en altres famílies espanyoles, però s'ha descrit en el BIC en 35 famílies, la majoria europees.

Per últim, en la regió 3' (exons 12-24) es van identificar set mutacions, tres de les quals es localitzen en l'exó 18 o els seus límits. Com veurem en el capítol 3, la delecio de tres nucleòtids 5196del3, que previsiblement causa la delecio d'una alanina en la posició 1693, i la nova mutació IVS18+5G>A, es poden considerar deletèries ja que causen la pèrdua (*skipping*) de l'exó 18. A més, el nostre i altres treballs indiquen que la variant *missense* S1715N és també una mutació associada a la malaltia.

Mutacions identificades en el gen *BRCA2*

En la sèrie de SP, es van detectar **11 mutacions** diferents en el gen *BRCA2*, en **20 famílies** amb CMOH (figura 17). A més, es van identificar **5 variants** amb un efecte biològic fins al moment desconegut, una d'elles en dues famílies.

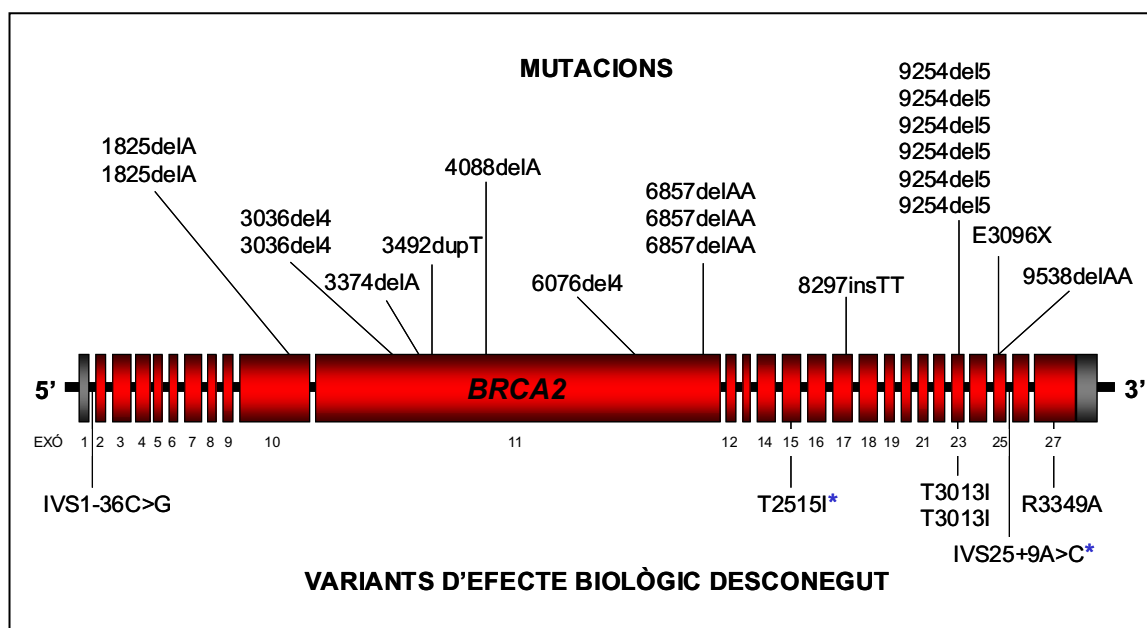


Figura 17 Mutacions i variants d'efecte biològic desconegut identificades en el gen *BRCA2*. Les seqüències traduïbles es representen en vermell. Els asteriscs (en blau) indiquen les variants el possible efecte biològic de les quals s'ha analitzat en aquest treball.

Només 1 de les 11 mutacions patogèniques identificades en *BRCA2* no és de tipus *frameshift*. Es tracta de la mutació *nonsense* E3096X, que consisteix en el canvi G>T

en el nucleòtid 9514, causant de l'aparició d'un codó d'aturada de la transcripció prematur. No s'han identificat mutacions que alterin el procés d'*splicing*.

Quatre mutacions apareixen en més d'una família. Com en *BRCA1*, algunes de les mutacions identificades a SP es presenten en altres famílies espanyoles o en altres poblacions (taula 12).

Taula 12 Mutacions identificades en el gen *BRCA2* i la seva presència en població espanyola i altres.

Mutació	Exó/intró	Sant Pau N	Multicèntric ¹ N ²	BIC (Febrer 06) N ²
1825delA	10	2	–	–
3036del4	11	2	12	77
3374delA	11	1	–	–
3492dupT	11	1	2	16
4088delA	11	1	–	1
6079del4	11	1	–	3
6857delAA	11	3	–	–
8297insTT	17	1	–	–
9254del5	23	6	3	8
E3096X	25	1	–	1
9538delAA	25	1	3	1

N : nº de vegades que s'ha identificat la mutació; guió (–) : no identificada. Totes les mutacions, excepte la *nonsense* E2096X, són del tipus *frameshift*.

¹ Annex de resultats; ² No s'inclouen les mutacions detectades a SP.

La mutació més freqüent, 9254del5, situada en l'exó 23 i identificada en sis famílies del nostre hospital, es descriu com una possible mutació fundadora catalano-llevantina en el present treball (Resultats 2.2), així com la mutació 6857delAA (Resultats 2.3), present en tres famílies. Aquestes dues mutacions representen el 45% (9/20) de totes les mutacions patogèniques identificades en les 20 famílies *BRCA2* (discutit més extensament en l'apartat 2).

Com en *BRCA1*, les mutacions trobades en el gen *BRCA2* es distribueixen al llarg de tota la seqüència, tot i que ens els primers nou exons (que representen una petita proporció del gen) no se'n va identificar cap. En l'exó 10 es va detectar una única mutació, 1825delA, en dues famílies, mentre que en l'exó 11 apareixen sis alteracions diferents, en un total de nou famílies. A part de la ja esmentada mutació 6857delAA, una altra variant apareix més d'una vegada. Es tracta de la mutació més comuna en *BRCA2* a Espanya, 3036del4, detectada en dues famílies de les nostres sèries i en 12 famílies espanyoles més (taula 12).

En la regió 3' del gen (exons 12 - 27) es van identificar quatre mutacions diferents, en un total de nou famílies. A part de la mutació recurrent 9254del5, les altres tres només es presenten una vegada. La primera, 8297insTT, situada en l'exó 18, no s'ha detectat en cap altra família. Les altres dues mutacions es localitzen en l'exó 25: la deleció 9538delAA, que apareix en tres famílies espanyoles més, i la mutació

nonsense E3096X, única en aquest treball i que s'ha descrit una vegada en el BIC en una família d'origen llatinoamericà/caribeny.

Proporció de les mutacions en *BRCA1* i *BRCA2*

En la sèrie de SP, no es van trobar grans diferències entre el percentatge de mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2*. El **49%** (19/39) de les famílies presentaven una mutació en ***BRCA1*** i el **51%** (20/39), en ***BRCA2***. En el conjunt de l'estat, s'observa un lleuger predomini de mutacions en ***BRCA1*** (57/108 = **53%**) respecte ***BRCA2*** (51/108 = **47%**) (Annex de resultats). Com s'observa en la taula 5 de la introducció, la majoria d'estudis realitzats en diferents poblacions mostren una major freqüència de mutacions en el gen *BRCA1*. No obstant això, hi ha una gran variabilitat, fins i tot en estudis dins la mateixa població, segons l'àrea geogràfica, el tipus de famílies estudiades i l'existència d'efectes fundadors.

En famílies espanyoles, diferents estudis mostren que la proporció de mutacions *BRCA1/BRCA2* és variable segons la procedència de les famílies analitzades (taula 13). Per exemple, en un estudi fet en 30 famílies gallegues (Vega *et al.*, 2002), totes les mutacions detectades es trobaven en el gen *BRCA1*. En un altre estudi fet en 76 famílies procedents de Galícia i del nord de Portugal (Duarte *et al.*, 2002), predominaven les mutacions en *BRCA1* (60%). En canvi, en els estudis de la Comunitat Valenciana (Bolufer *et al.*, 2005) i Catalunya (Llort *et al.*, 2002; present treball), s'observa un lleuger predomini de mutacions en *BRCA2*.

Així, sembla que en les regions del nord-oest de la península ibèrica predominen les mutacions en *BRCA1*, mentre que en les regions del nord-est les mutacions en *BRCA2* són lleugerament més prevalents. En la resta, s'observen divergències entre els diferents estudis (taula 13). Com discutirem amb més detall en l'apartat 2, aquestes diferències subpoblacionals podrien ser degudes a l'existència d'efectes fundadors. En aquest sentit, quatre de les vuit famílies positives de l'estudi de Vega *et al.* (2002) presentaven la mutació *BRCA1* 330A>G, que segons els resultats presentats en aquest treball (Resultats 2.1), és una mutació fundadora gallega. Entre les famílies estudiades a SP, 9 de les 20 famílies amb mutacions en *BRCA2* presenten una de les dues mutacions que segons els resultats presentats en aquest treball són probablement mutacions fundadores de l'àrea catalano-llevantina: 9254del5 (Resultats 2.2) i 6857delAA (Resultats 2.3).

Taula 13 Freqüència de mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* en famílies espanyoles amb CMOH.

Referències	Mètodes de detecció	Famílies Risc	n	<i>BRCA1</i> %	<i>BRCA2</i> %	Total %
Castella i Lleó						
Velasco Sampedro <i>et al.</i> (2002) ¹	CSGE	Total	153	5,2	7,2	12,4
		↑↑	49	8,1	12,3	20,4
		↑	93	4,3	5,3	9,6
Salazar <i>et al.</i> (2006)	CSGE	Total	92	5,4	5,4	10,8
		↑↑	25	20,0	12,0	32,0
		↑	67	0	3,0	3,0
Catalunya						
Llort <i>et al.</i> (2002)	SD	Total	35	17,0	20,0	37,2
		↑↑	19	21,0	21,0	42,0
		↑	16	12,5	18,8	31,3
Present treball ²	PTT, SSCP	Total	127	15,0	15,7	30,7
		↑↑	93	14,0	18,3	32,3
		↑	34	17,6	8,8	26,4
Galícia – Nord de Portugal						
Duarte <i>et al.</i> (2002)	CSGE, SSCP	Total*	76	3,9	2,6	6,5
Vega <i>et al.</i> (2002)	SD, SSCP	Total	30	26,7	0	26,7
		↑↑	15	33,3	0	33,3
		↑	15	6,7	0	6,7
Madrid						
Gomendio <i>et al.</i> (1999)	SD, SSCP	Total*	42	-	2,4	-
Osorio <i>et al.</i> (2000)	PTT, SSCP	↑↑	32	9,4	15,6	25,0
De la Hoya <i>et al.</i> (2002) ³	CSGE, DGGE, PTT, SSCP	↑	102	18,7	12,7	30,0
Navarra						
Salgado <i>et al.</i> (2005)	SD	Total*	50	8,0	16,0	24,0
Comunitat Valenciana						
Blesa <i>et al.</i> (2000)	CSGE, PTT	Total*	51	14,0	-	-
Bolufer <i>et al.</i> (2005)	CSGE	Total	48	8,3	12,5	20,8
		↑↑	18	11,1	22,2	33,3
		↑	30	6,7	3,3	10,0
Espanya						
Multicèntric (Annex de resultats)	CSGE, DGGE, PTT, SD, SSCP	Total	410	13,9	12,4	26,3
		↑↑	307	14,0	14,7	28,7
		↑	103	13,6	5,8	19,4

¹ En 11 famílies es desconeix la història familiar; ² Reuneix els resultats obtinguts en 127 famílies diagnosticades a SP; ³ Inclou una família amb una mutació en *BRCA1* i una altra en *BRCA2*.
Risc: ↑↑ : alt (≥ 3 casos CM/CO o CM en home); ↑ : moderat (2 casos CM/CO). * : no s'especifiquen les mutacions trobades en els diferents grups de risc.
SD: seqüenciació directa.

1.2 FREQUÈNCIA DE MUTACIONS EN FAMÍLIES AMB CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI

Les freqüències de mutacions en els gens *BRCA* obtingudes en els diferents estudis fets en famílies amb CMOH són **molt variables**, principalment a causa de l'origen ètnic o geogràfic de la població analitzada i dels criteris de selecció de les famílies (Serova *et al.*, 1997; Szabo i King, 1997; Chen *et al.*, 1998c). En població espanyola, les freqüències totals oscil·len entre el 10,8 i el 37,2% de famílies amb mutació (taula 13).

En la sèrie de SP es van detectar 39 mutacions patogèniques entre les 127 famílies seleccionades, que representa una freqüència del **30,7%**. La freqüència obtinguda en l'estudi multicèntric (Annex de resultats) va ser del **26,3%**, del mateix ordre que les descrites en altres poblacions, com la grega (21,6%) (Ladopoulou *et al.*, 2002), la belga (24,4%) (Claes *et al.*, 2004) i l'alemanya (30,4%) (Meindl *et al.*, 2002). Aquestes freqüències, però, són relativament baixes comparat amb les d'altres treballs (Kiechle *et al.*, 2000, Gorski *et al.*, 2004). La distribució de les mutacions segons el fenotip de les famílies i els resultats obtinguts en l'estudi de SP i el multicèntric, es mostren en la taula 14.

Taula 14 Freqüència de les mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* en els estudis de Sant Pau (SP) i el multicèntric (M).

Grup fenotípic	Famílies		<i>BRCA1</i>		<i>BRCA2</i>		Total <i>BRCA</i>	
	SP	M	SP	M	SP	M	SP	M
	N	N	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
CM + CO								
≥3 (CM + CO)	30	79	10 (33,3)	27 (34,2)	6 (20,0)	13 (16,4)	16 (53,3)	40 (50,6)
2 (CM + CO)	9	17	2 (22,2)	7 (41,2)	1 (11,1)	3 (17,6)	3 (33,3)	10 (58,8)
Subtotal	39	96	12 (30,8)	34 (35,4)	7 (17,9)	16 (16,7)	19 (48,7)	50 (52,1)
CM dones								
≥3 CM	53	206	3 (5,6)	16 (7,8)	6 (11,3)	19 (9,2)	9 (17,0)	35 (17,0)
2 CM	25	86	4 (16,0)	7 (8,1)	2 (8,0)	3 (3,5)	6 (24,0)	10 (11,6)
Subtotal	78	292	7 (9,0)	23 (7,9)	8 (10,2)	22 (7,5)	15 (19,2)	45 (15,4)
CM homes								
≥ 1 CM masculí + ≥1 CM + ≥ CO	10	22	0	0	5 (50,0)	13 (59,1)	5 (50,0)	13 (59,1)
TOTAL	127	410	19 (15,0)	57 (13,9)	20 (15,7)	51 (12,4)	39 (30,7)	108 (26,3)

CM: càncer de mama; CO: càncer d'ovari.

S'han comparat les freqüències de mutació de *BRCA1*, *BRCA2* i del "Total *BRCA*" obtingudes en els diferents grups dels dos estudis mitjançant la prova de la χ^2 i no s'han trobat diferències estadísticament significatives. Ja que els resultats obtinguts en la sèrie de SP (127 famílies) són equiparables als de la sèrie de l'estudi multicèntric (410 famílies), es comentaran principalment els resultats d'aquest últim estudi.

Frequència de mutacions segons el fenotip familiar

En l'estudi de Kiechle *et al.* (2000) es va detectar una mutació en els gens *BRCA* en el 47,3% de les famílies analitzades. Mentre que en el treball de Kiechle només es van incloure famílies d'**alt risc** (amb tres o més casos de càncer de mama i/o ovari, o algun cas de càncer de mama en home), tant en les nostres sèries com en els altres estudis mencionats s'inclouen famílies d'alt risc i famílies de **risc moderat** (amb dos casos de càncer de mama i/o ovari), fet que afavoreix l'obtenció de percentatges més baixos. En aquest sentit, en un estudi del BCLC (Ford *et al.*, 1998), de 237 famílies amb almenys 4 casos de càncer de mama es va detectar una mutació en el 87%, confirmant que, si bé les mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* expliquen la major part de les famílies amb molts afectes, només una petita proporció de les famílies amb 2 o 3 casos presenten una mutació en un d'aquests dos gens. D'altra banda, un estudi de 200 famílies poloneses d'alt risc va obtenir una freqüència total de mutacions del 64,5% (Gorski *et al.*, 2004). En aquest cas, l'elevat percentatge de mutacions es pot explicar tant pels criteris de selecció utilitzats com per l'existència de forts efectes fundadors en la població polonesa.

En famílies espanyoles, tot i que en la majoria d'estudis s'han inclòs tant famílies d'alt risc com de risc moderat (taula 13), la proporció dels dos grups de famílies és diferent en cada cas. La nostra sèrie, de 410 famílies en total, està formada per 307 famílies d'alt risc, en les quals vam detectar una mutació en el 28,7%, i per 103 famílies de risc moderat, amb una freqüència de mutació del 19,4%. Donat que tres quartes parts de les famílies seleccionades són d'alt risc, la freqüència global de mutació (26,3%) és similar a la d'aquest grup. Contràriament, en l'estudi de Salazar *et al.* (2006), de les 92 famílies seleccionades (25 d'alt risc i 65 de risc moderat) es va detectar mutació en 32% de les famílies del primer grup i en el 3% del segon. La freqüència total va ser del 10,8%, molt inferior a la del nostre treball i altres estudis fets en només famílies d'alt risc (Osorio *et al.*, 2000; De la Hoya *et al.*, 2002).

En general, els percentatges més alts de mutacions apareixen en les famílies considerades d'alt risc (de tres o més casos de càncer). Tanmateix, en l'estudi multicèntric, en el subgrup de famílies amb càncer de mama i ovari el percentatge de mutacions en les famílies de risc moderat (58,8%) va ser superior al de les famílies considerades d'alt risc (50,6%). Encara que el nombre de famílies en aquest subgrup és més baix i el poder estadístic més limitat, aquests resultats indiquen que no és possible una distinció clara entre alt risc i risc moderat únicament en termes de nombre d'afectats en la família, especialment amb presència de càncer d'ovari. Per altra banda, no es disposa dels arbres familiars complets de les famílies corresponents a aquest grup i, per tant, no es coneix el nombre de dones susceptibles de desenvolupar un càncer. Així, cal tenir en compte l'existència de famílies amb poques dones (o pocs individus), amb un nombre creixent en la nostra societat. En aquestes famílies, la baixa incidència de càncer no és equivalent a una baixa probabilitat de mutació o un baix risc (King *et al.*, 2003).

En les famílies amb pocs casos de càncer es fa necessari considerar altres indicadors de probabilitat de mutació (edat al diagnòstic, altres neoplàsies, càncer de mama bilateral, tipus tumorals, possibles factors modificadors, etc.). En qualsevol cas, sembla recomanable oferir l'estudi genètic a aquelles famílies amb dues dones afectes, sobretot davant la presència d'un cas de càncer d'ovari.

Pel que fa al tipus de càncer, entre les famílies espanyoles analitzades (Annex de resultats), els majors percentatges de mutacions apareixen en les famílies amb càncer de **mama en homes (59,1%)** i amb càncer d'**ovari (52,1%)**, respecte aquelles que només presenten càncer de **mama en dones (15,4%)** (taula 14). Aquest resultat està en consonància amb els factors de predicció de mutació descrits anteriorment (Introducció 5.1) i en estudis realitzats a Espanya (Osorio *et al.*, 2000; de la Hoya *et al.*, 2002) i altres poblacions (Meindl *et al.*, 2002; Claes *et al.*, 2004) (taula 15), els quals indiquen que el càncer d'ovari i el de mama en homes s'associen a una alta probabilitat de ser portador de mutació, sobretot en el gen *BRCA1* i *BRCA2*, respectivament.

Taula 15 Freqüència de les mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* en diferents grups fenotípics de famílies amb CMOH.

Referències	CM + CO			CM dones			CM homes		
	<i>BRCA1</i> %	<i>BRCA2</i> %	Total %	<i>BRCA1</i> %	<i>BRCA2</i> %	Total %	<i>BRCA1</i> %	<i>BRCA2</i> %	Total %
Present treball ¹	30,8	17,9	48,7	9,0	10,2	19,2	0	50,0	50,0
Annex de resultats	35,4	16,7	52,1	7,9	7,5	15,4	0	59,1	59,1
Meindl <i>et al.</i> (2002)	42,4	9,6	52,0	15,0	8,0	23,0	2,1	23,4	25,5
Claes <i>et al.</i> (2004)	34,4	9,4	43,8	11,2	6,5	17,7	0	41,7	41,7
Osorio <i>et al.</i> (2000)	40,0	0	40,0	4,5	9,1	13,5	0	60,0	60,0
De la Hoya <i>et al.</i> (2002) ²	29,7	13,5	43,2	10,2	3,4	15,2	0	100,0	100,0

CM: càncer de mama; CO: càncer d'ovari.

¹ Reuneix els resultats obtinguts de 127 famílies diagnosticades a SP. ² Inclou una família amb una mutació en *BRCA1* i una altra en *BRCA2*.

Exceptuant l'estudi de Meindl *et al.* (2002), amb una freqüència de mutacions similar en les famílies amb només càncer de mama en dones (23,0%) i en les famílies amb algun cas de càncer de mama masculí (25,5%), tots els estudis mostren percentatges de mutacions més elevades en els grups amb càncer d'ovari o amb càncer de mama en homes. La baixa proporció de mutacions trobada entre les famílies amb només càncer de mama en dones, tant a SP (19,2%) com en el conjunt de l'estat (15,4%), suggereix que la majoria d'aquestes famílies estan associades a altres gens de susceptibilitat.

De les 96 famílies amb **càncer de mama i ovari**, 50 presentaven mutació (50/96 = **52,1%**), 34 en *BRCA1* i 16 en *BRCA2*. Encara que estudis preliminars suggerien que la majoria de casos hereditaris de càncer de mama i ovari s'explicaven per mutacions en *BRCA1*, els nostres resultats coincideixen amb alguns estudis anteriors (Thorlacius *et al.*, 1995; Couch *et al.*, 1996; Tavgian *et al.*, 1996), en els que el càncer d'ovari era present fins a un 48% de les famílies amb mutacions patogèniques en *BRCA2*. En els diferents estudis que es mostren en la taula 15, s'han detectat mutacions en ambdós gens, excepte en l'estudi d'Osorio *et al.* (2000), en el qual totes les mutacions detectades en les famílies amb càncer de mama i ovari es troben en el gen *BRCA1*. Aquest resultat, però, no exclou l'associació entre mutacions en *BRCA2* i càncer d'ovari, ja que en el mateix estudi totes les famílies portadores i amb càncer de mama en homes presentaven també càncer d'ovari.

Així, tot i que el poder estadístic per estudiar determinades associacions és limitat a causa del nombre reduït de famílies analitzades, aquest resultat és consistent amb l'evidència creixent sobre la contribució d'ambdós gens a la incidència global al càncer d'ovari (Risch *et al.*, 2001). En aquest estudi poblacional, en el qual es van analitzar 649 dones amb càncer d'ovari, es van detectar 60 mutacions, 39 en *BRCA1* i 21 en *BRCA2*, totes en el grup de 515 dones amb un tumor de tipus invasiu. Els autors destaquen el fet que, mentre gairebé tots (83%) els càncers d'ovari diagnosticats abans dels 50 anys eren deguts a mutacions en *BRCA1*, la majoria (60%) dels tumors diagnosticats després dels 60 anys eren deguts a mutacions en *BRCA2*.

Famílies sense cap mutació detectada en *BRCA1* o *BRCA2*

Malgrat l'extens cribratge mutacional, 88 famílies (69,3%) estudiades en el nostre hospital romanen negatives per mutacions en el gens *BRCA1* i *BRCA2*, tot i que la majoria mostren una clara predisposició pel càncer de mama i d'ovari. En el conjunt de l'estat (Annex de resultats), aquest percentatge va ser semblant, del 73,7%. Aquests resultats concorden amb estudis anteriors que mostren percentatges de mutacions molt més baixos que en estudis inicials de lligament (Serova *et al.*, 1997; Ford *et al.*, 1998; Nathanson i Weber, 2001; Antoniou *et al.*, 2002), i suggereixen l'existència d'altres gens de susceptibilitat. A més, poden haver-hi altres causes que contribueixin al baix percentatge de mutacions detectades en la mostra seleccionada, algunes de les quals es resumeixen a continuació:

- **Característiques de la mostra seleccionada:** com ja s'ha discutit, les famílies seleccionades en el nostre estudi són heterogènies pel què fa al nombre de casos, fet que afavoreix l'obtenció de percentatges globals més baixos. Addicionalment, la major part de les famílies no presenta cap cas de càncer d'ovari o de càncer de mama en homes, dos dels principals factors de predicció de presència de mutació en els gens *BRCA*.
- **Estudi de fenocòpies:** atesa l'elevada prevalença del càncer de mama en la població general, existeix la possibilitat que l'individu seleccionat per realitzar l'anàlisi (provand) presenti un càncer de tipus esporàdic. En aquest cas, tot i pertànyer a una família amb una mutació, no seria possible detectar-la. L'existència de fenocòpies es demostra amb la identificació en algunes famílies de familiars afectes no portadors de la mutació.
- **Insuficiències tècniques:** la capacitat de detecció de mutacions dels mètodes utilitzats no és completa. El mètode amb més especificitat i sensibilitat per a la detecció de mutacions puntuals és la seqüenciació directa de tota la regió codificant del gen i de les regions intròniques properes. Tanmateix, no està exempt d'artefactes o de falsos negatius, que poden produir-se, per exemple, al coincidir la localització de la mutació i del lloc d'hibridació del *primer*, de manera que no s'amplifiqui ni es seqüenciï l'al·lel alterat (exemple: *BRCA1* 1294del40, no detectada amb els *primers* més habitualment utilitzats). Per altra banda, a causa de la gran mida dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, aquest mètode resulta molt laboriós i car. Com a alternativa, s'utilitzen mètodes de cribratge mutacional menys sensibles, com l'SSCP i la PTT. S'estima que la tècnica d'SSCP té una sensibilitat al voltant del 70% en la detecció de substitucions d'una sola base.

Tot i que la PTT es considera un mètode ràpid i eficient i ha estat extensament utilitzat per identificar mutacions truncants en els exons més llargs dels gens *BRCA* (11 en *BRCA1* i 10 i 11 en *BRCA2*), difícilment detecta les mutacions localitzades en les regions extremes dels productes traduïts. Mentre que les C-terminals poden causar diferències minúscules de mida respecte el transcrit normal, no resolubles en l'electroforesi, les N-terminals poden causar productes massa petits per ser detectats, degut a la poca o nul·la incorporació de marcatge o a la migració electroforètica fora de l'interval de resolució. Un exemple d'aquest tipus és la mutació *BRCA2* 2157delG, situada a l'inici de l'exó 11 del gen, que va poder ser detectada mitjançant SSCP, però no per PTT, en un estudi fet en famílies de la Gran Bretanya amb CMOH (Davies *et al.*, 2000). Els autors suggerien que aquesta mutació, que fins al moment no havia estat identificada en cap família britànica, podia ser molt freqüent en aquesta població, i haver estat omesa degut a la utilització de la PTT per a l'anàlisi de l'exó 11 de *BRCA2* en la majoria de laboratoris. Un estudi posterior va identificar la mutació en el 20% dels homes amb càncer de mama amb mutació en *BRCA2* (Evans *et al.*, 2001) i, més recentment, l'anàlisi de l'haplotip de nou famílies portadores suggereix que és una mutació fundadora originària del nord-est d'Anglaterra (Evans *et al.*, 2004).

- **Mutacions no detectables mitjançant la tecnologia utilitzada:** les tècniques utilitzades en aquest treball, SSCP i PTT, així com altres mètodes similars (com DGGE i CSGE) i la seqüenciació, només permeten detectar mutacions puntuals i petites insercions o delecions. Atès que la PTT només detecta mutacions de tipus truncant, entre les famílies estudiades que han resultat ser negatives podrien haver-hi casos de **mutacions missense** en les regions estudiades mitjançant aquesta tècnica.

Algunes famílies presenten **grans reordenaments** genòmics que només poden ser detectats per mètodes addicionals. En aquest sentit, Unger *et al.* (2000) van identificar un gran reordenament en el gen *BRCA1* en 5 (11,9%) de les 42 famílies americanes amb CMOH que havien resultat prèviament negatives per mutacions *BRCA* mitjançant CSGE o seqüenciació. Recentment, un estudi amb MLPA fet en famílies espanyoles sense mutació detectada ni en *BRCA1* ni en *BRCA2* per mètodes convencionals ha permès identificar grans reordenaments en *BRCA1* en el 2,1% de les famílies amb tres o més casos de càncer (de la Hoya *et al.*, en premsa). Aquest valor és de l'ordre dels estudis d'altres poblacions com Alemanya (6%) (Hartmann *et al.*, 2004) i França (5,9%) (Gad *et al.*, 2002), però molt inferior a l'observat en poblacions amb efectes fundadors en les quals els grans reordenaments representen un elevat percentatge del total de mutacions identificades en el gen *BRCA1*, com Holanda (27%) (Hogervorst *et al.*, 2003) i Itàlia (40%) (Montagna *et al.*, 2003), si bé en aquest cas, en una curta sèrie de famílies. En *BRCA2*, estudis preliminars mostren també un baix percentatge de grans reordenaments (Gutiérrez-Enríquez *et al.*, 2005), de l'ordre de l'obtingut en famílies australianes (2,3%) (Woodward *et al.*, 2005) i italianes (2,5%) (Agata *et al.*, 2005) i, majoritàriament associades a famílies amb homes amb càncer de mama (Tournier *et al.*, 2004).

Finalment, no s'han analitzat ni la zona del promotor ni regions intròniques no properes a exons, que podrien presentar mutacions capaces d'alterar l'estabilitat de l'RNA. En els gens *BRCA*, però, aquests tipus de mutacions s'han descrit en comptades ocasions (BIC).

- **Variants d'efecte biològic desconegut:** en aquest estudi s'han considerat únicament com a mutacions patogèniques les variants que trenquen el marc de lectura, les que han mostrat alterar el procés normal d'*splicing* del pre-mRNA i les mutacions *missense* que segons els resultats d'aquest i altres treballs són mutacions associades a la malaltia. Així, els percentatges de mutacions detectades podrien ser superiors als comentats.
- **Altres gens de susceptibilitat:** per a l'anàlisi dels gens *BRCA1* i *BRCA2* es seleccionen els individus o famílies que presenten la síndrome de càncer de mama i ovari hereditari. No obstant, existeixen alteracions en altres gens que poden causar síndromes clíniques associades a diverses neoplàsies, entre elles el càncer de mama, no sempre diferenciables: *p53* (síndrome de Li-Fraumeni), *CHEK2* (síndrome de Li-Fraumeni *like*) *ATM* (atàxia telangiectàsica) o *PTEN* (síndrome de Cowden) (vegeu Introducció 4.1). Part de les famílies sense mutació identificada podrien presentar mutacions en algun d'aquests altres gens de predisposició. En un estudi fet en 300 famílies americanes, amb almenys quatre casos de càncer de mama o ovari i prèviament diagnosticades com a negatives per mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* mitjançant mètodes convencionals (Walsh *et al.*, 2006), es van detectar mutacions en el gen *CHEK2* en 14 pacients, el que representa una freqüència del 5% del total, i en *p53* en 3 pacients, un 1%. De forma rellevant, cap de les 14 pacients amb una mutació en *CHEK2* presentava característiques de síndrome de Li-Fraumeni-*like* i, en canvi, una pacient amb mutació en *p53* tenia característiques d'aquesta síndrome. Malgrat que vuit de les famílies estudiades presentaven característiques de síndrome de Cowden, i que estudis previs mostren un elevat percentatge de mutacions en aquest gen entre les famílies que compleixen els criteris de la síndrome esmentada (Marsh *et al.*, 1998), en aquest treball no es va detectar cap mutació en el gen *PTEN*. D'altra banda, en el mateix estudi es van identificar 35 individus amb un gran reordenament genòmic en *BRCA1* o *BRCA2*, valor que representa un 12% del total.

En població espanyola, i a diferència d'estudis fets en poblacions del nord d'Europa que descriuen la mutació 1100delC en el gen *CHEK2* (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002; Vahteristo *et al.*, 2002), dos estudis recents no l'han detectat en famílies que havien resultat negatives per mutacions en els gens *BRCA* (Osorio *et al.*, 2004; Bellosillo *et al.*, 2005). Un estudi paral·lel, fet en 162 dones basques amb càncer de mama, va detectar la mutació 1100delC en l'1,1% de les pacients analitzades (Martínez-Bouzas *et al.*, 2005).

- **Altres causes de l'agregació familiar:** finalment, l'agrupació familiar de càncer de mama i d'ovari pot reflectir la combinació de l'efecte de molts gens de baixa penetrància, juntament amb els mediambientals o, fins i tot, ser casual, degut a l'alta prevalença de càncers de mama esporàdics.

1.3 FREQUÈNCIA DE MUTACIONS EN PACIENTS SENSE HISTÒRIA FAMILIAR

En l'anàlisi molecular dels gens *BRCA1* i *BRCA2* en 214 pacients sense història familiar (Annex de resultats), es van detectar cinc mutacions en el grup de 195 dones amb càncer de mama o ovari, però cap en el grup de 19 homes amb càncer de mama.

Dones amb càncer de mama o ovari sense antecedents familiars

En el grup de dones sense història familiar, es van identificar tres mutacions en *BRCA1* i dues en *BRCA2* ($5/195 = 2,6\%$). Quatre de les dones presentaven càncer de mama, diagnosticat entre els 23 i 36 anys. La cinquena va ser diagnosticada de càncer de mama als 48 anys i d'ovari, als 61. La baixa freqüència observada pot ser causada per la inclusió en l'estudi de dones amb càncer esporàdic diagnosticat després dels 50 anys. Aquest resultat és menor que l'obtingut en una altra sèrie espanyola de 105 pacients amb càncer de mama esporàdic en la que només es va estudiar el gen *BRCA1* i es van identificar sis mutacions ($6/105 = 5,7\%$) (Garcia-Patiño *et al.*, 1998).

A diferència del treball de Garcia-Patiño *et al.*, la majoria d'estudis no basats en famílies amb CMOH s'han fet en dones seleccionades segons l'edat (la majoria diagnosticades abans dels 40 anys), independentment dels antecedents familiars (vegeu taula 4 de la Introducció). En la majoria dels casos, el percentatge de mutacions és inferior al 10%. Per exemple, De Sanjosé *et al.* (2003) van trobar mutacions en el 6,6% de 136 dones amb càncer de mama abans dels 46 anys i Martínez-Ferrandis *et al.* (2003), en el 5,5% de 124 dones diagnosticades de càncer de mama abans dels 41 anys.

Els resultats del nostre estudi i el fet que en els estudis mencionats s'hagin trobat mutacions en dones sense antecedents, suggereixen que les estratègies de cribratge basades exclusivament en la història familiar són insuficients. Tal com s'ha indicat en les famílies amb dos casos de càncer, caldria afegir altres indicadors de risc (edat al diagnòstic, presència de càncer d'ovari, tipus histològic del tumor, etc.).

Homes amb càncer de mama sense antecedents familiars

En el grup de 19 homes amb càncer de mama sense història familiar no es va detectar cap mutació. La major part d'estudis d'homes amb càncer de mama s'han basat en casos no seleccionats per la història familiar i, en general, indiquen una baixa prevalença de mutacions en *BRCA1* en la majoria de poblacions (0-10%) (Weiss *et al.*, 2005). En canvi, les prevalences de mutacions en *BRCA2* són molt variables segons la població analitzada. En població americana, un estudi poblacional fet en 54 homes amb càncer de mama (Friedman *et al.*, 1997), el 30% dels quals presentaven antecedents familiars, es varen detectar dues mutacions en *BRCA2* ($2/54 = 4\%$). Només un dels individus tenia història familiar. A Hongria, un estudi paral·lel en 18 pacients (Csokay *et al.*, 1999), el 22% dels quals amb història familiar, va identificar sis mutacions en *BRCA2* ($6/18 = 33\%$). Cap dels portadors presentava antecedents.

Aquestes discrepàncies entre els estudis podrien ser degudes al baix nombre de casos en cada sèrie. Addicionalment, són poc coneguts els factors que influeixen en l'epidemiologia i la fisiopatologia del càncer de mama masculí.

1.4 CORRELACIONS GENOTIP – FENOTIP

Diversos estudis han descrit diferències en el risc de desenvolupar càncer de mama o d'ovari depenent de la posició de les mutacions en els gens *BRCA1* o *BRCA2* (vegeu Introducció 2.5.5). Per tal de contrastar les hipòtesis postulades en aquests estudis, vam analitzar les dades obtingudes en les sèries espanyoles (Annex de resultats).

***BRCA1*: l'extrem 5' i risc de càncer d'ovari**

En *BRCA1*, Gayther *et al.* (1995) van descriure una **major incidència** de càncer de mama respecte càncer d'ovari en la **regió 5'** del gen, entre els nucleòtids 1 i 4447. Posteriorment, Thompson i Easton (2002c), van definir una regió central de *BRCA1*, entre els nucleòtids 2401 i 4190, amb una major proporció de càncer d'ovari:mama respecte les altres dues regions del gen (figura 10A).

En les nostres sèries, dividint el gen en dues parts, amb el punt de tall situat en el nucleòtid 4427, vam trobar que la proporció de càncer de mama:ovari era estadísticament diferent: 1,68 entre els nucleòtids 1 i 4427, i 5,28 del nucleòtid 4428 en endavant. Aquesta observació dona suport a la hipòtesi que mutacions a 5' s'associen a un major risc de càncer d'ovari. En canvi, al dividir el gen en tres regions, les diferències en les proporcions entre els nucleòtids 1-2400 (1,63) i 2401-4190 (2,00) no van ser estadísticament significatives, segurament a causa del poc nombre de mutacions trobades en la regió central de *BRCA1*.

D'altra banda, la freqüència anormalment elevada de tumors d'ovari observada en les sis famílies amb la mutació *BRCA1* 330A>G (Resultats 2.1), situada dins la regió 5' descrita per Gayther *et al.*, també concorda amb la correlació proposada. Tres de les sis famílies portadores presentaven càncer d'ovari, amb 7 casos en total.

***BRCA2*: l'Ovarian Cancer Cluster Region (OCCR) i risc de càncer d'ovari**

En *BRCA2*, s'ha proposat l'existència d'una regió de 3,3 kb en l'exó 11, entre els nucleòtids 3035 i 6629, anomenada *Ovarian Cancer Cluster Region* (OCCR), associada a un major risc de càncer d'ovari (figura 10B) (Gayther *et al.*, 1997a; Thompson *et al.*, 2001).

Les dades obtingudes de les sèries de l'estudi multicèntric (Annex de resultats) no donen suport a aquesta hipòtesi, ja que en l'OCCR no es va trobar una major incidència de tumors d'ovari respecte tumors de mama que en la resta del gen. Les 10 famílies amb mutacions en l'OCCR presentaven 32 casos de càncer de mama i 4 d'ovari, comparat amb els 152 casos de càncer de mama i 21 d'ovari en les 41

famílies amb mutacions fora d'aquesta regió. A més, de les 20 famílies amb càncer d'ovari, només 4 presentaven mutació en l'OCCR.

Els resultats de les famílies diagnosticades al nostre hospital tampoc mostren una correlació entre l'OCCR i un increment de càncer d'ovari. D'una banda, en l'estudi del gen *BRCA2* fet en 87 famílies sense mutació identificada en *BRCA1* (Resultats 1.2), les quatre famílies amb mutacions en l'OCCR contenien 10 casos de càncer de mama (un d'ells masculí) i només 1 de mama i ovari, comparat amb els 3 casos de càncer d'ovari i els 33 de càncer de mama en 11 famílies amb mutacions en altres regions del gen. A més, tot i que la mutació 9254del5 es troba en l'extrem 3' del gen *BRCA2*, fora de l'OCCR, en les 12 famílies amb aquesta mutació hi havia 7 dones amb mutació diagnosticades de càncer d'ovari (Resultats 2.2).

Edat al diagnòstic

No es van trobar diferències entre les mitjanes d'edats de diagnòstic de càncer de mama o d'ovari entre els portadors de mutacions en *BRCA1* localitzades a 3' o a 5' del nucleòtid 4447.

Diversos estudis basats en dues mutacions fundadores en el gen *BRCA2*, la jueva 6174delT (Neuhausen *et al.*, 1998) i la islandesa 999del5 (Thorlacius *et al.*, 1997) han suggerit que les mutacions en l'OCCR són menys penetrants pel càncer de mama. En la sèrie de l'estudi multicèntric i en les de SP (Resultats 1.2), no es van trobar diferències significatives comparant l'edat al diagnòstic del càncer segons la localització de la mutació en *BRCA2* respecte l'OCCR.

Tampoc no es van trobar diferències entre l'edat al diagnòstic de càncer de mama en les famílies amb mutació en *BRCA1* o en *BRCA2*.

1.5 ALTRES NEOPLÀSIES EN FAMÍLIES AMB MUTACIÓ

Tal i com hem vist en l'apartat 2.5.3 de la introducció, les mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* s'associen a un augment del risc d'altres tipus de tumors a part dels de mama i ovari. A Espanya, fins al moment no hi ha estudis que comparin la prevalença d'altres neoplàsies en famílies positives per mutacions en *BRCA1* i *BRCA2*, en famílies negatives i en població general. En l'estudi multicèntric, gairebé totes les famílies amb mutació identificada presentaven alguna altra neoplàsia com pròstata, còlon, fetge, estómac, pulmó i endometri, però no es va trobar cap correlació entre la seva presència i la distribució o tipus de mutacions *BRCA*.

En la sèrie de SP, algunes de les famílies positives presentaven casos d'altres neoplàsies, però en la majoria no va ser possible determinar l'estatus de portador de cada individu, de manera que no s'ha pogut fer cap associació. Per exemple, entre les famílies amb mutació en el gen ***BRCA2*** (Resultats 1.2), hi havia quatre famílies amb càncer de **pròstata** (tres casos en una mateixa família) i quatre famílies amb sis casos en total de càncer d'**endometri**, però es desconeix el seu significat ja que la presència de l'al·lel mutat no es va poder determinar en cada afectat. Tanmateix,

aquests resultats concorden amb els publicats pel Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC, 1999), que mostren més freqüència de tumors de pròstata en les famílies *BRCA2*. Pel que fa al carcinoma d'endometri, tot i que s'han descrit casos d'associacions especialment amb *BRCA1* (Hornreich *et al.*, 1999), un estudi retrospectiu fet en 199 pacients jueves asquenases amb carcinoma d'endometri no va mostrar un risc augmentat al llarg de la vida d'aquests tipus de tumors en dones amb mutacions germinals *BRCA* (Levine *et al.*, 2001b). En aquest treball es van analitzar les tres mutacions fundadores característiques d'aquesta població i es van identificar tres portadores, una en *BRCA1* i dues en *BRCA2*. Aquest resultat representa una freqüència de l'1,5%, inferior a 2% observat en la població general.

Com en els estudis de penetrància, les **mutacions recurrents** són útils per estudiar aquests tipus d'associacions, però es necessita un gran nombre de famílies per obtenir resultats significatius. En el nostre cas, disposem de poques famílies amb la mateixa mutació per obtenir resultats fiables. Entre les sis famílies amb la mutació *BRCA1* 330A>G hi havia individus portadors amb càncer d'endometri, duodenal o de còlon (Resultats 2.1). De la mateixa manera, els individus portadors de la mutació *BRCA2* 6857delAA expressen una àmplia varietat de fenotips: càncer de mama precoç i altres tumors en una mateixa dona, càncer d'ovari i homes amb càncer de mama o de pròstata. Finalment, entre les 12 famílies amb la mutació 9254del5 hi havia vuit homes amb càncer de mama (Resultats 2.2), fet que suggereix que aquesta mutació és altament predisposant per aquesta neoplàsia específica, tot i que es necessitarien més dades per confirmar l'associació. També hi havia casos de melanoma, càncer de pàncrees i càncer de pròstata, resultat que concorda amb estudis recents que suggereixen que les mutacions en *BRCA2* confereixen un risc augmentat de càncer de mama en homes i d'aquestes altres neoplàsies (BCLC, 1999; van Asperen *et al.*, 2005).

En resum, l'ampli espectre de càncers observat en les famílies portadores d'aquestes tres mutacions recurrents, *BRCA1* 330A>G, *BRCA2* 9254del5 i *BRCA2* 6857delAA, suggereix que altres factors ambientals, gens modificadors de risc o altres gens de susceptibilitat podrien estar també implicats en el fenotip final.

2 MUTACIONS RECURRENENTS

Com s'ha dit, la majoria de les mutacions identificades en els gens *BRCA1* i *BRCA2* s'han descrit només una vegada, però n'hi ha que apareixen de forma recurrent en més d'una família. En aquests casos, l'anàlisi de l'haplotip pot evidenciar l'origen únic d'una mutació específica present en diverses famílies no emparentades, els avantpassats de les quals poden remuntar-se a un origen geogràfic o ètnic comú. Alguns exemples de poblacions amb mutacions fundadores altament prevalents són la jueva asquenasa i la islandesa (vegeu Introducció 2.4).

2.1 MUTACIONS RECURRENENTS EN POBLACIÓ ESPANYOLA

Estudis previs no mostren evidències de l'existència d'un petit nombre de mutacions fundadores altament prevalents en *BRCA1* i *BRCA2* que representin la majoria de casos hereditaris de càncer de mama a l'Estat Espanyol, resultat que no és sorprenent donada la heterogeneïtat genètica de la població espanyola (Osorio *et al.*, 1998).

En l'estudi multicèntric es van detectar 19 mutacions que apareixien de forma recurrent en més d'una família, 10 en *BRCA1* i 9 en *BRCA2*, nou de les quals van ser identificades en almenys una família tractada al nostre hospital (figura 18). Cinc mutacions en *BRCA1* (185delAG, 330A>G, 589delCT, G1706E i A1708E), representen el 46,6% (28/60) de les mutacions detectades en aquest gen i quatre mutacions (3036del4, 6857delAA, 9254del5, i 9538delAA), el 56,6% (30/53) de les mutacions identificades en el gen *BRCA2*. En conjunt, les **nou mutacions** suposen el **51,3%** (58/113) de totes les mutacions detectades.

En la sèrie de 127 famílies de SP, dues mutacions (185delAG i 243delA) representen el 31,6% (6/19) de les detectades en *BRCA1* i quatre mutacions (3036del4, 1825delA, 6857delAA i 9254del5), el 65% (13/20) de les identificades en *BRCA2*. En conjunt, representen el **48,7%** (19/39) de les mutacions detectades. Un altre estudi efectuat en la mateixa àrea geogràfica (Llort *et al.*, 2002) troba que el 23% de les famílies portadores presenten una mutació de les considerades recurrents.

Segons l'estudi multicèntric, les dues mutacions més prevalents en la nostra població són la ***BRCA2* 3036del4** (14 famílies) i la ***BRCA1* 185delAG** (10 famílies), identificades en individus procedents de diverses regions del país. En ambdós casos, diversos estudis suggereixen l'existència d'efectes fundadors. La mutació *BRCA2* 3036del4 s'ha trobat en diversos països de l'oest d'Europa (com Bèlgica, França, Itàlia, i Suïssa) i en els Estats Units i Canadà (BIC). L'anàlisi de marcadors microsatèl·lits va suggerir que el seu origen podria ser únic unes 80 generacions enrera (95% CI, 46-134) (Neuhausen *et al.*, 1998). La mutació *BRCA1* 185delAG té el seu origen en poblacions jueves i la prevalença més elevada en població jueva asquenasa (Struwing *et al.*, 1995).

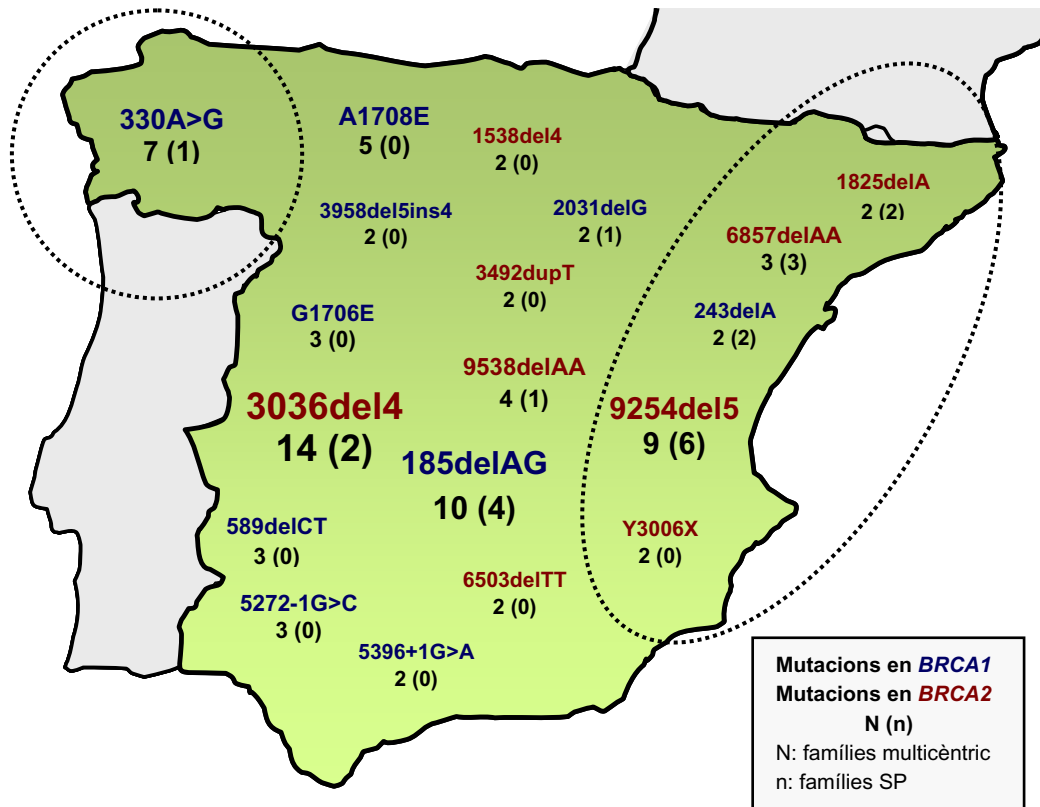


Figura 18 Mutacions recurrents en els gens *BRCA1* i *BRCA2* detectades en famílies espanyoles amb CMOH. Dins de les el·lipses es representen mutacions amb un probable efecte fundador en la zona emmarcada. La mida de la lletra és proporcional al número de vegades que s'ha identificat la mutació.

A banda d'aquestes dues mutacions identificades arreu, s'observen almenys dues zones de la península amb mutacions característiques: la regió nord-oest (Galícia) i l'àrea mediterrània (figura 18). A **Galícia**, fins al moment s'ha descrit només una mutació característica, la ***BRCA1* 330A>G**, probablement originada en aquesta regió. En l'**àrea mediterrània** s'han identificat cinc mutacions recurrents que podrien ser característiques d'aquesta regió. Les mutacions ***BRCA1* 243delA** i ***BRCA2* 1825delA** no havien estat descrites prèviament i només es van identificar en famílies catalanes tractades en el nostre hospital, cada una en dues ocasions. La mutació ***BRCA2* Y3006X**, es va identificar en dues famílies valencianes i en el BIC només es descriu en una família de l'oest d'Europa. Les altres dues mutacions, ***BRCA2* 6857delAA** i ***BRCA2* 9254del5**, detectades en tres i nou famílies respectivament, es descriuen com a possibles mutacions fundadores.

2.2 CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS RECURRENENTS: ANÀLISI DE L'HAPLOTIP

En la sèrie estudiada a SP es va analitzar l'haplotip de dues mutacions recurrents en *BRCA2* (9254del5 i 6857delAA) i, a més, de la mutació *BRCA1* 330 A>G, present en una família gallega de la nostra sèrie i detectada en altres famílies originàries de la mateixa regió.

Anàlisi de l'haplotip associat a la mutació *BRCA1* 330A>G

La mutació 330A>G es descriu 20 vegades en el BIC (febrer 2006) en famílies espanyoles i d'altres zones d'Europa (França i el Regne Unit), així com en famílies del Carib i de Sud-amèrica. En la majoria de les famílies s'indica un origen probablement espanyol (BIC). En el nostre estudi (Resultats 2.1), presentem els resultats de l'anàlisi de l'haplotip de sis famílies en les quals se'ls ha detectat aquesta mutació: quatre d'origen gallec, una família francesa d'origen colombià i una família britànica de procedència espanyola.

Els resultats dels estudis de l'haplotip, construït mitjançant l'anàlisi de sis microsatèl·lits situats dins o prop de *BRCA1* (cen-THRA1, D17S800, D17S855, D17S1323, D17S1327 i D17S579 –tel), mostren que tots els portadors tenen els mateixos al·lels pels sis marcadors, excepte en tres al·lels situats en els extrems de l'haplotip. Aquests resultats suggereixen un efecte fundador, amb algunes discrepàncies, que poden ser degudes a un *slippage* en la replicació (causant de la pèrdua o guany d'unitats de repetició durant la meiosi) o a esdeveniments de recombinació.

Així, els nostres resultats són consistents amb la possibilitat que les famílies estudiades compartissin un avantpassat comú amb la mutació *BRCA1* 330A>G, essent aquesta una mutació fundadora d'origen gallec. En aquest sentit, un estudi basat en l'anàlisi del DNA mitocondrial de 92 individus gallecs (Salas *et al.*, 1998), mostra que Galícia presenta un relatiu aïllament genètic de la resta d'Europa, de forma similar que el descrit en el País Basc.

Anàlisi de l'haplotip associat a la mutació *BRCA2* 9254del5

En l'anàlisi de l'haplotip de la mutació *BRCA2* 9254del5 (Resultats 2.2), vam incloure les 12 famílies amb la mutació identificades entre 841 famílies i 339 dones amb càncer de mama o d'ovari analitzades en diversos centres de França i Espanya. Totes les famílies provenien de l'àrea mediterrània i del sud de França. A més, nou de les famílies presentaven cognoms catalans. Per adreçar la qüestió de l'origen de la mutació, vam construir l'haplotip amb 8 marcadors microsatèl·lits polimòrfics (cen-D13S1700, D13S260, D13S1698, (*BRCA2*), D13S171, D13S695, D13S1694, D13S310 i D13S267-tel), flanquejant el locus *BRCA2*, i dos polimorfismes interns (1342A>C i 7470A>G) en membres de les famílies portadores de la mutació.

Tots els portadors tenien el mateix al·lel d'almenys quatre marcadors i dels dos polimorfismes, essent compatible amb un origen comú. L'edat estimada de la mutació 9254del5 es va calcular al voltant de 92 generacions (CI 95% = 56 – 141). L'ampli interval de l'estimació és degut al petit nombre relatiu d'haplotips disponibles per l'anàlisi.

Anàlisi de l'haplotip associat a la mutació *BRCA2* 6857delAA

La mutació 6857delAA en l'exó 11 de *BRCA2* va ser identificada en 3 famílies del nostre hospital. Aquesta alteració havia estat descrita recentment en una família xilena (Carvalho *et al.*, 2002), que vam incloure en el nostre estudi (Resultats 2.3), i fins al moment no s'ha descrit en altres poblacions (BIC). Segons les dades recollides en les respectives històries familiars, les quatre famílies analitzades procedeixen de Catalunya.

Els haplotips observats, construïts mitjançant l'anàlisi de cinc marcadors microsatèl·lits que flanquegen el gen *BRCA2* (cen-D13260, D13S1698, (*BRCA2*), D13S171, D13S310 i D13S267-tel) van mostrar al·lells idèntics en tots els portadors en tres o més marcadors que rodegen el gen, fet que indica l'existència d'un avantpassat comú en aquestes famílies.

2.3 APLICACIONS DE L'ESTUDI DE MUTACIONS RECURRENTS

La presència de mutacions específiques en *BRCA1* i *BRCA2* en una població determinada depèn en part de l'origen ètnic i geogràfic de les famílies analitzades. Els nostres resultats recolzen la hipòtesi de l'existència d'una subestructura poblacional pels gens *BRCA1* i *BRCA2* (Vega *et al.*, 2002). Val a dir que no es van incloure famílies de zones potencialment característiques, com ara el País Basc (població caracteritzada pel seu aïllament genètic i lingüístic) o les Illes Balears i Canàries.

El coneixement de mutacions fundadores associades a un origen ètnic o geogràfic determinat, presenta un gran nombre d'aplicacions, com el disseny d'un cribratge mutacional més eficient i la realització d'estudis de penetrància i altres associacions.

Disseny d'un cribratge mutacional en població espanyola

La identificació de mutacions recurrents en poblacions d'origen ben definit pot facilitar l'establiment d'estratègies metodològiques que facin més ràpida i econòmica la detecció de mutacions. Segons les dades obtingudes en l'estudi multicèntric, sembla recomanable iniciar l'estudi del gen *BRCA1* amb l'anàlisi dels exons 2, 5, 8 i 18 i del gen *BRCA2*, amb els extrems 5' i 3' de l'exó 11, l'exó 23 i l'exó 25. No obstant això, en la gran majoria de famílies l'estudi haurà de prosseguir fins a cobrir la totalitat del gen. Per altra banda, a mesura que augmenti la identificació de famílies portadores pot variar la freqüència relativa de cada mutació, fent necessària l'actualització constant dels algorismes.

Disseny d'un cribratge mutacional en altres poblacions

Les mutacions recurrents reflecteixen influències històriques de migracions, estructura poblacional i aïllament geogràfic o cultural (Neuhausen, 1999; Szabo i King, 1997). Per exemple, diversos estudis recents fets als Estats Units (Nanda *et al.*, 2005; Weitzel *et al.*, 2005; Haffty *et al.*, 2006), mostren diferències en l'espectre de mutacions entre els individus pertanyents a diverses races o ètnies (blancs, afroamericans, jueus asquenases i hispans).

Els desplaçaments poblacionals tenen una gran importància en els països de parla hispana. Històricament, la Península Ibèrica ha estat exposada a diversos móns ètnics i culturals: europeus, africans i mediterranis. Algunes mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* identificades de forma recurrent en la nostra població s'han trobat a altres països europeus, com la mutació *BRCA2* 3036del4. A més, diverses mutacions europees han estat també trobades als Estats Units i Canadà, reflectint les migracions des del continent fins a Nord Amèrica. De forma semblant, moltes famílies hispanoamericanes poden traçar els seus orígens fins la colonització espanyola durant els segles XVI i XVII i, en èpoques més recents, fins els moviments migratoris des de diverses regions d'Espanya. Un exemple és la presència de la mutació *BRCA1* 185delAG a Califòrnia (EEUU) en individus americans d'origen espanyol (Mullineaux *et al.*, 2003), probablement fruit de l'emigració de població jueva forçada per la Inquisició (Díez *et al.*, 1999; Long, 2004). Altres exemples són l'aparició de la mutació *BRCA1* 330A>G en famílies de Centre i Sudamèrica i de l'àrea del Carib amb avantpassats gallecs (BIC), i de la mutació *BRCA2* 6857delAA en una família xilena d'origen català. Fins al moment, gairebé no s'han publicat estudis amplis dels gens *BRCA1* i *BRCA2* a Llatinoamèrica. A Xile, en un estudi de 54 famílies, es descriuen tres mutacions noves, però cinc de les 11 identificades són mutacions recurrents espanyoles (Gallardo *et al.*, 2006).

Tenint en compte la gran heterogeneïtat d'alteracions possibles i la laboriositat que suposa la seva detecció, la recerca de mutacions recurrents originades a Espanya pot ser d'utilitat a l'hora d'establir algorismes d'anàlisis mutacionals més racionals i menys costoses en aquestes poblacions.

Estudis en individus portadors de la mateixa alteració

Les mutacions recurrents tenen un especial valor al proporcionar la possibilitat de realitzar estudis en grups d'individus amb la mateixa alteració genètica i, en cas de les fundadores, similar fons genètic. El fet de disposar de múltiples famílies amb la mateixa mutació permet estudiar factors genètics i ambientals addicionals que contribueixen a les variacions fenotípiques (presència d'altres neoplàsies, edat al diagnòstic, etc). A més, es pot avaluar l'expressivitat i la penetrància específiques d'una mutació, d'utilitat en el càlcul de risc i l'assessorament genètic.

3 ESTUDI DE VARIANTS D'EFECTE BIOLÒGIC DESCONEGUT

En els gens *BRCA1* i *BRCA2* s'han detectat centenars de variants diferents (BIC). Les tècniques basades en el DNA genòmic permeten la seva identificació, però, en moltes ocasions, són insuficients per establir el seu significat biològic. No poden considerar-se com associades a malaltia ni polimorfismes innocus i romanen classificades com a variants d'efecte biològic desconegut. Ja que la comprensió incompleta del seu potencial efecte patològic dificulta l'assessorament genètic dels pacients, calen anàlisis addicionals (vegeu Introducció 2.6).

3.1 ESTUDI DEL mRNA: EFECTES EN L'*SPLICING*

Estudis recents en *BRCA1* (Liu *et al.*, 2001), *BRCA2* (Fackenthal *et al.*, 2002) i en altres gens (Ars *et al.*, 2000; Cartegni i Krainer, 2002a i b; Pagani *et al.*, 2002) descriuen mutacions *missense*, mutacions traduccionament silencioses i variants intròniques que alteren la transcripció. Aquests treballs i els nostres resultats destaquen la importància d'estudiar tant el DNA com el RNA, per tal de clarificar l'efecte real del canvi identificat.

En la sèrie de SP, es van detectar 15 variants d'efecte biològic desconegut, 10 en *BRCA1* (figura 16) i 5 en *BRCA2*, una d'elles en dues famílies (figura 17). En nou d'elles, es va poder analitzar el RNA i es van utilitzar diverses estratègies per predir el seu possible efecte patològic.

Es va demostrar, per seqüenciació del cDNA de portadors (apartats 2.1 i 3 de Resultats), l'existència d'un *splicing* aberrant en quatre variants en *BRCA1*: 330A>G, 5196del3 (Ala1693del), IVS18+5G>A i IVS22-2G>A. Les variants G1706A, S1715N i IVS20-6_IVS20-4del en *BRCA1*, i T2515I i IVS25+9A>G (ara 9729+9A>C) en *BRCA2*, van mostrar transcrits madurs normals.

Variants que alteren el procés d'*splicing*

El canvi A>G en la posició 330 del gen *BRCA1* (***BRCA1 330A>G***), consisteix en la transició d'una adenina per una guanina que, aparentment, prediu un canvi d'aminoàcid en la proteïna (R71G). Aquesta substitució, però, es localitza en la posició -2 del lloc donador d'*splicing* de l'exó 5. L'anàlisi de la seqüència del cDNA va mostrar la deleció de 22 pb en l'exó 5, que causa l'aparició d'un codó de terminació alterant-se, previsiblement, la síntesi proteica.

La variant ***BRCA1 5196del3***, que presumptament consisteix en la pèrdua d'una alanina en la posició 1693, provoca la pèrdua (*skipping*) de l'exó 18, sense trencar el marc de lectura, i la deleció de 26 aminoàcids a la proteïna. El mateix efecte presenta la variant ***BRCA1 IVS18+5G>A***. Atès que l'exó 18 forma part d'un dels altament conservats dominis BRCT de la proteïna *BRCA1*, la seva absència pot associar-se a una pèrdua funcional.

Per últim, la variant **BRCA1 IVS22-2A>G**, situada en el lloc acceptor d'*splicing* de l'exó 23, provoca l'*skipping* de l'exó, causant l'aparició d'un codó de terminació prematur. Aquest efecte havia estat descrit prèviament en la mutació IVS23+1G>A (Laskie Ostrow *et al.*, 2001).

Els resultats obtinguts indiquen que l'estudi addicional de l'RNA pot aportar informació que modifiqui l'efecte deduït exclusivament a partir de l'anàlisi del DNA.

Variants que no afecten el procés d'*splicing*

Les variants *missense* **BRCA1 G1706A**, **BRCA1 S1715N** i **BRCA2 T2515I**, i les variants intròniques **BRCA1 IVS20-6_IVS20-4del** i **BRCA2 IVS25+9A>G**, van mostrar transcrits madurs normals.

Variants missense

A més de l'estatus de l'RNA, els criteris per avaluar la patogenicitat d'una variant *missense* inclouen la segregació amb la malaltia, l'absència en població sana, les diferències físicoquímiques del nou aminoàcid respecte l'original, la conservació del residu en les diferents espècies, la localització en un domini conservat i possiblement funcional de la proteïna i la pèrdua d'heterozigositat en el teixit tumoral (vegeu Introducció 2.6).

El potencial patogènic de les variants **BRCA1 G1706A** i **S1715N** no es pot descartar completament ja que es localitzen en el domini C-terminal de **BRCA1**, el qual presenta activitat de transactivació. Diversos estudis mostren que mutacions *missense* associades a risc de càncer i localitzades en aquesta regió, anul·len l'activitat transcripcional de **BRCA1** en sistemes artificials (Chapman i Verma, 1996; Monteiro *et al.*, 1997 i 1998; Hayes *et al.*, 2000; Vallon-Christersson *et al.*, 2001; Phelan *et al.*, 2005).

Diverses evidències suggerien que la variant **G1706A** podia ser patogènica: a) una variant molt propera, **A1708E**, identificada en cinc famílies espanyoles (Annex de resultats), mostrava una pèrdua d'activitat transcripcional (Vallon-Christersson *et al.*, 2001); b) no es va trobar en 100 cromosomes control; c) el residu es manté en seqüències de gos, rata, ratolí i pollastre i es localitza en una zona amb una conservació completa en aquestes espècies; d) en la proteïna, el reemplaçament d'una aminoàcid petit hidrofòbic (glicina) per un aminoàcid sense càrrega (alanina) és una substitució no conservativa. Aquesta hipòtesi es veuria reforçada pels resultats d'un estudi recent segons els quals **G1706A** provoca una pèrdua gairebé total d'activitat transcripcional en cèl·lules mamàries (Phelan *et al.*, 2005). Els autors suggereixen que podria tractar-se d'una variant d'efecte moderat. En un altre estudi, on es van integrar mètodes genètics, bioinformàtics i funcionals per caracteritzar les variants **G1706A** i **A1708E** (Lovelock *et al.*, 2006), es va concloure que la variant **G1706A** és probablement un polimorfisme, mentre que la variant **A1708E** sembla patogènica. Malgrat tot, cap d'aquests estudis és conclouent i la variant **G1706A** roman com a variant no classificada.

La variant **S1715N** es va detectar en una família amb tres casos de càncer de mama. S1715 és un residu evolutivament conservat i mostra pèrdua d'activitat en estudis funcionals, suggerint la seva associació a la malaltia (Vallon-Christersson *et al.*, 2001). Aquesta hipòtesi es veu reforçada pel fet que dos dels tres membres afectes de família presentaven la mutació i per l'observació de la pèrdua de l'al·lel salvatge en un dels tumors analitzats. En un altre treball, en el qual s'estudien els possibles efectes del canvi aminoacídic en l'estructura (i previsiblement, en la funció) de la proteïna (Mirkovic *et al.*, 2004), no es va poder demostrar clarament el seu caràcter patogènic i roman com a variant d'efecte biològic desconegut.

En **BRCA2**, la variant **T2515I** produïa també transcrits normals. Tanmateix, algunes evidències suggereixen que podria tractar-se d'una mutació: cosegrega en els individus afectes en una família amb càncer de mama; no es va trobar en 100 cromosomes control; el residu T2515 es conserva parcialment en l'escala filogenètica però, a nivell proteic, el reemplaçament no conservatiu d'una treonina per una isoleucina podria afectar l'estructura i la funció de la proteïna. Per tant, ja que aquesta variant compleix només alguns criteris de patogenicitat, roman sense classificar.

Variants intròniques

Les variants intròniques que no afecten el procés d'*splicing* previsiblement desapareixen després de la maduració del pre-mRNA (de manera que no afecten ni l'estructura ni la funció de la proteïna) i s'assumeix que són innòcues. Malgrat tot, la detecció d'un únic producte d'*splicing* normal mitjançant la tècnica de RT-PCR no exclou totalment la possibilitat d'una alteració en l'RNA.

En aquest sentit, el producte de l'al·lel amb la variant **BRCA1 IVS22-2A>G** es va observar en una menor proporció que el producte amb l'al·lel normal. Tot i que la baixa proporció podria atribuir-se a la possibilitat que l'exó 23 del pre-mRNA IVS22-2A>G fos ocasionalment processat correctament, no es pot descartar que sigui deguda a un fenomen d'inestabilitat dels transcrits amb mutació truncant (**NMD**, de **nonsense-mediated mRNA decay**). El NMD és un mecanisme de vigilància o control que redueix errors en l'expressió gènica eliminant mRNAs aberrants que codifiquen per polipèptids incomplets, causant una reducció d'1,5 a 5 vegades els nivells de mRNA (Perrin-Vidoz *et al.*, 2002). Aquest fet dificulta la detecció dels transcrits mutats entre els transcrits de l'al·lel normal.

Per tant, encara que no es pot descartar que les variants **BRCA1 IVS20-6_IVS20-4del** i **BRCA2 IVS25+9A>G** siguin mutacions associades a la malaltia, el més probable és que siguin polimorfismes poc freqüents.

3.2 AVALUACIÓ TEÒRICA D'ALTERACIONS EN L'*SPLICING*

En els darrers anys s'han elaborat diversos mètodes teòrics que prediuen l'efecte de variants genòmiques en el processament del pre-mRNA. Per tal d'avaluar l'eficàcia de dos d'aquests mètodes (explicats amb més detall en l'apartat 4.2 de Material i mètodes), vam comparar les seves prediccions amb els resultats d'un mètode empíric, com és l'anàlisi de l'RNA de portadors per RT-PCR (Resultats 3).

Seqüències consens

Les regions intròniques i exòniques adjacents als límits dels exons presenten seqüències consens amb un cert nombre de nucleòtids altament conservats. Una alteració en algun d'aquests nucleòtids pot afectar el procés normal d'*splicing* i aparèixer productes aberrants. Les tres variants intròniques detectades en el gen *BRCA1*, localitzades en les seqüències consens de l'exó 18 (IVS18+5G>A), 21 (IVS20- 6_IVS20-4del) i 23 (IVS22-2A>G), es van analitzar utilitzant el mètode de Shapiro i Senapathy (1987). Els valors consens per les seqüències d'*splicing* implicades en les tres variants, calculats d'acord amb aquest mètode, concorden amb l'efecte observat en el processament de l'RNA, donant suport a la validesa d'aquest model.

Per les variants que es troben fora d'aquesta regió, com la *BRCA2* IVS25+9A>C, l'estimació dels valors consens podria ser útil per predir llocs críptics d'*splicing*. De totes maneres, els estudis d'RNA són essencials per descobrir si un procés d'*splicing* és afectat per un canvi nucleotídic o no.

Seqüències ESE

L'**ESEfinder** és un programa informàtic capaç d'identificar possibles seqüències potenciadores de l'*splicing* (**ESE**, d'*Exonic Splicing Enhancer*) en qualsevol regió exònica. Aquestes seqüències són llocs d'unió de quatre proteïnes riques en serina i arginina (SR): SF2/ASF, SC35, SRp40 i SRp55, les quals "marquen" els exons perquè no siguin exclosos durant el procés d'*splicing* del pre-mRNA.

La comparació dels resultats de l'anàlisi d'una seqüència de cDNA amb una variant al·lèlica amb els d'una seqüència normal permet identificar qualsevol guany o pèrdua de seqüències ESE predites. Aquest guany o aquesta pèrdua podrien fer variar el processament correcte del mRNA i produir-se un *splicing* aberrant. Com a precedent, l'anàlisi de l'RNA va demostrar que la transversió 5199G>T en l'exó 18 de *BRCA1* causava l'*skipping* de l'exó 18 en comptes del codó de terminació esperat (E1694X) (Mazoyer *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). Aquesta substitució G>T trenca una ESE d'unió a la proteïna SF2/ASF.

En el nostre estudi (Resultats 3), l'anàlisi amb l'ESEfinder va predir que les variants 5196del3 i G1706A en *BRCA1*, i T2515I en *BRCA2*, podrien produir transcrits anòmals a causa del trencament previst de ESEs de les proteïnes SF2/ASF, SC35 i SRp55, respectivament. No obstant, la seqüenciació del cDNA dels portadors mostrarà que les variants G1706A i T2515I produïen transcrits normals. A més, la mutació

BRCA1 330A>G, que com hem vist provoca un *splicing* anormal, fins i tot augmenta el valor de predicció d'una ESE de SRp40 (de 3,831 per la seqüència salvatge a 4,399 per la mutada). Tot i que altres treballs mostren una concordança entre els resultats predits utilitzant aquest mètode i els de l'anàlisi de l'RNA (Fackenthal *et al.*, 2002;), els nostres resultats suggereixen que les prediccions d'*splicing* basades en les seqüències ESE no són definitius i s'haurien de considerar amb precaució.

CONCLUSIONS

- Les famílies espanyoles amb càncer de mama i ovari hereditari presenten una gran diversitat al·lèlica en els gens *BRCA1* i *BRCA2*, amb les mutacions distribuïdes al llarg de tota la seqüència.
- Globalment, la proporció de mutacions identificades en cada gen és similar, però varia segons la procedència geogràfica de la família analitzada: predominen lleugerament les mutacions de *BRCA1* en el nord-oest de la Península Ibèrica i les de *BRCA2* en les regions mediterrànies.
- La freqüència global de mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* en les famílies estudiades (propera al 30%) és similar a la trobada en altres poblacions.
- En general, el percentatge de mutacions augmenta amb el nombre de casos de càncer en la família, però l'elevada freqüència observada en famílies amb 2 casos (especialment amb presència de càncer d'ovari), indica que l'avaluació del risc o de la probabilitat de mutació no es pot basar únicament en el nombre de dones afectades de la família.
- En aquestes famílies amb pocs casos de càncer, incloses les dones sense antecedents familiars, serien necessaris altres indicadors de probabilitat de mutació: edat al diagnòstic, existència de càncer de mama bilateral, característiques histopatològiques tumorals, altres neoplàsies associades, possibles factors modificadors, etc. En qualsevol cas, sembla recomanable oferir l'estudi genètic a aquelles famílies amb dues dones afectes, sobretot davant la presència d'un cas de càncer d'ovari.
- S'evidencia la relació entre càncer d'ovari i *BRCA1* i càncer de mama en homes i *BRCA2*. El càncer d'ovari s'associa principalment a mutacions localitzades en l'extrem 5' de *BRCA1*, però no amb les de la regió OCCR de *BRCA2*.
- La identificació d'haplotips específics associats a la mutació 330A>G en *BRCA1*, present en famílies d'origen gallec, i a les mutacions 9254del5 i 6857delAA en *BRCA2*, presents en famílies de l'àrea mediterrània, suggereix l'existència de subpoblacions espanyoles amb mutacions característiques.
- En la majoria de casos, el disseny d'un algoritme d'anàlisi amb el següent ordre permetria augmentar l'eficiència de l'estudi mutacional: 1) anàlisi dels fragments que contenen mutacions recurrents en l'àrea geogràfica corresponent (independentment del fenotip familiar); 2) anàlisi de *BRCA1* en famílies amb casos de càncer d'ovari i anàlisi de *BRCA2* en famílies amb càncer de mama en homes; 3) anàlisi de la resta de la seqüència d'ambdós gens.
- L'estudi de l'RNA permet conèixer millor l'efecte biològic de determinades variants identificades en els gens *BRCA1* i *BRCA2* i és recomanable sempre que sigui possible. Malgrat tot, en molts casos són necessaris estudis addicionals per obtenir resultats concloents.
- Els resultats obtinguts amb diversos mètodes teòrics per predir potencials alteracions en l'*splicing* no coincideixen totalment amb els observats en l'estudi de l'RNA i s'han de considerar amb prudència.

BIBLIOGRAFIA

A

- Abel, K. J., Xu, J., Yin, G. Y., Lyons, R. H., Meisler, M. H. and Weber, B. L.** (1995). Mouse Brca1: localization sequence analysis and identification of evolutionarily conserved domains. *Hum Mol Genet* 4, 2265-73.
- Abkevich, V., Zharkikh, A., Deffenbaugh, A. M., Frank, D., Chen, Y., Shattuck, D., Skolnick, M. H., Gutin, A. and Tavtigian, S. V.** (2004). Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet* 41, 492-507.
- Agata, S., Dalla Palma, M., Callegaro, M., Scaini, M. C., Menin, C., Ghiotto, C., Nicoletto, O., Zavagno, G., Chieco-Bianchi, L., D'Andrea, E. et al.** (2005). Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families. *J Med Genet* 42, e64.
- Alvarez, S., Diaz-Uriarte, R., Osorio, A., Barroso, A., Melchor, L., Paz, M. F., Honrado, E., Rodriguez, R., Urioste, M., Valle, L. et al.** (2005). A predictor based on the somatic genomic changes of the BRCA1/BRCA2 breast cancer tumors identifies the non-BRCA1/BRCA2 tumors with BRCA1 promoter hypermethylation. *Clin Cancer Res* 11, 1146-53.
- Andersen, T. I., Borresen, A. L. and Moller, P.** (1996). A common BRCA1 mutation in Norwegian breast and ovarian cancer families? *Am J Hum Genet* 59, 486-7.
- Anglian Breast Cancer Study Group** (2000). Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. *Br J Cancer* 83, 1301-8.
- Antoniou, A. C., Gayther, S. A., Stratton, J. F., Ponder, B. A. and Easton, D. F.** (2000). Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol* 18, 173-90.
- Antoniou, A. C., Pharoah, P. D., McMullan, G., Day, N. E., Stratton, M. R., Peto, J., Ponder, B. J. and Easton, D. F.** (2002). A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer* 86, 76-83.
- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M. and Meltzer, P. S.** (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-8.
- Armes, J. E., Trute, L., White, D., Southey, M. C., Hammet, F., Tesoriero, A., Hutchins, A. M., Dite, G. S., McCredie, M. R., Giles, G. G. et al.** (1999). Distinct molecular pathogenesis of early-onset breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a population-based study. *Cancer Res* 59, 2011-7.
- Ars, E., Serra, E., Garcia, J., Kruyer, H., Gaona, A., Lazaro, C. and Estivill, X.** (2000). Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 9, 237-47.

B

Baer, R. and Ludwig, T. (2002). The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev* 12, 86-91.

Baldwin, R. L., Nemeth, E., Tran, H., Shvartsman, H., Cass, I., Narod, S. and Karlan, B. Y. (2000). BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 60, 5329-33.

Bar-Sade, R. B., Kruglikova, A., Modan, B., Gak, E., Hirsh-Yechezkel, G., Theodor, L., Novikov, I., Gershoni-Baruch, R., Risel, S., Papa, M. Z. et al. (1998). The 185delAG BRCA1 mutation originated before the dispersion of Jews in the diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet* 7, 801-5.

Barkardottir, R. B., Sarantaus, L., Arason, A., Vehmanen, P., Bendahl, P. O., Kainu, T., Syrjakoski, K., Krahe, R., Huusko, P., Pyrhonen, S. et al. (2001). Haplotype analysis in Icelandic and Finnish BRCA2 999del5 breast cancer families. *Eur J Hum Genet* 9, 773-9.

Bau, D. T., Mau, Y. C. and Shen, C. Y. (2005). The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Lett* sept 16.

BCLC. (1997). Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 349, 1505-10.

BCLC. (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *J Natl Cancer Inst* 91, 1310-6.

Bebb, D. G., Yu, Z., Chen, J., Telatar, M., Gelmon, K., Phillips, N., Gatti, R. A. and Glickman, B. W. (1999). Absence of mutations in the ATM gene in forty-seven cases of sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 80, 1979-81.

Beckmann, M. W., Picard, F., An, H. X., van Roeyen, C. R., Dominik, S. I., Mosny, D. S., Schnurch, H. G., Bender, H. G. and Niederacher, D. (1996). Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 73, 1220-6.

Beger, C., Pierce, L. N., Kruger, M., Marcusson, E. G., Robbins, J. M., Welcsh, P., Welch, P. J., Welte, K., King, M. C., Barber, J. R. et al. (2001). Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 130-5.

Bell, D. W., Varley, J. M., Szydlo, T. E., Kang, D. H., Wahrer, D. C., Shannon, K. E., Lubratovich, M., Verselis, S. J., Isselbacher, K. J., Fraumeni, J. F. et al. (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286, 2528-31.

Bellosillo, B., Tusquets, I., Longaron, R., Perez-Lezaun, A., Bellet, M., Fabregat, X., Serrano, S. and Sole, F. (2005). Absence of CHEK2 mutations in Spanish families with hereditary breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 161, 93-5.

Bennett, L. M., Brownlee, H. A., Hagavik, S. and Wiseman, R. W. (1999). Sequence analysis of the rat Brca1 homolog and its promoter region. *Mamm Genome* 10, 19-25.

Berchuck, A., Heron, K. A., Carney, M. E., Lancaster, J. M., Fraser, E. G., Vinson, V. L., Deffenbaugh, A. M., Miron, A., Marks, J. R., Futreal, P. A. et al. (1998). Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 4, 2433-7.

Berry, D. A., Parmigiani, G., Sanchez, J., Schildkraut, J. and Winer, E. (1997). Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. *J Natl Cancer Inst* 89, 227-38.

Berry, D. A., Iversen, E. S., Jr., Gudbjartsson, D. F., Hiller, E. H., Garber, J. E., Peshkin, B. N., Lerman, C., Watson, P., Lynch, H. T., Hilsenbeck, S. G. et al. (2002). BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol* 20, 2701-12.

(BIC) Breast Cancer Information Core: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>

Bignell, G., Micklem, G., Stratton, M. R., Ashworth, A. and Wooster, R. (1997). The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet* 6, 53-8.

Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E. and Pardee, A. B. (2000). Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8542-7.

Blesa, J. R., Garcia, J. A. and Ochoa, E. (2000). Frequency of germ-line BRCA1 mutations among Spanish families from a Mediterranean area. *Hum Mutat* 15, 381-2.

Boardman, L. A., Thibodeau, S. N., Schaid, D. J., Lindor, N. M., McDonnell, S. K., Burgart, L. J., Ahlquist, D. A., Podratz, K. C., Pittelkow, M. and Hartmann, L. C. (1998). Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med* 128, 896-9.

Bochar, D. A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W. S., Wang, W., Kashanchi, F. and Shiekhattar, R. (2000). BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102, 257-65.

Bolufer, P., Munarriz, B., Santaballa, A., Velasco, E., Lerma, E. and Barragan, E. (2005). [BRCA1 and BRCA2 mutations in patients with familial breast cancer]. *Med Clin (Barc)* 124, 10-2.

Bonadona, V., Sinilnikova, O. M., Chopin, S., Antoniou, A. C., Mignotte, H., Mathevet, P., Bremond, A., Martin, A., Bobin, J. Y., Romestaing, P. et al. (2005). Contribution of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations to the incidence of breast cancer in young women: results from a prospective population-based study in France. *Genes Chromosomes Cancer* 43, 404-13.

Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altschul, S. F. and Koonin, E. V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J* 11, 68-76.

Brodie, S. G. and Deng, C. X. (2001). BRCA1-associated tumorigenesis: what have we learned from knockout mice? *Trends Genet* 17, S18-22.

Brose, M. S., Rebbeck, T. R., Calzone, K. A., Stopfer, J. E., Nathanson, K. L. and Weber, B. L. (2002). Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 94, 1365-72.

Brzovic, P. S., Meza, J., King, M. C. and Kleivit, R. E. (1998). The cancer-predisposing mutation C61G disrupts homodimer formation in the NH₂-terminal BRCA1 RING finger domain. *J Biol Chem* 273, 7795-9.

Brzovic, P. S., Meza, J. E., King, M. C. and Kleivit, R. E. (2001). BRCA1 RING domain cancer-predisposing mutations. Structural consequences and effects on protein-protein interactions. *J Biol Chem* 276, 41399-406.

Buchholz, T. A., Weil, M. M., Ashorn, C. L., Strom, E. A., Sigurdson, A., Bondy, M., Chakraborty, R., Cox, J. D., McNeese, M. D. and Story, M. D. (2004). A Ser49Cys variant in the ataxia telangiectasia, mutated, gene that is more common in patients with breast carcinoma compared with population controls. *Cancer* 100, 1345-51.

C

Callebaut, I. and Mornon, J. P. (1997). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 400, 25-30.

Cantor, S. B., Bell, D. W., Ganesan, S., Kass, E. M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D. C., Sgroi, D. C., Lane, W. S., Haber, D. A. et al. (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105, 149-60.

Cartegni, L., Chew, S. L. and Krainer, A. R. (2002a). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-98.

Cartegni, L. and Krainer, A. R. (2002b). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30, 377-84.

Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q. and Krainer, A. R. (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31, 3568-71.

Carvalho, M., Palma, L., Gallardo, M., Rousseau, C. and King, M. (2002). Analysis of mutations in the BRCA2 gene in Chilean families with breast cancer. *J Med Genet* 10 (Supp 1): 84

Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C. F. and Solomon, E. (1999). Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18, 1957-65.

Catteau, A. and Morris, J. R. (2002). BRCA1 methylation: a significant role in tumour development? *Semin Cancer Biol* 12, 359-371.

Chamberlain, N. L., Driver, E. D. and Miesfeld, R. L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 22, 3181-6.

Chan, K. Y., Ozcelik, H., Cheung, A. N., Ngan, H. Y. and Khoo, U. S. (2002). Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 4151-6.

-
- Chapman, M. S. and Verma, I. M.** (1996). Transcriptional activation by BRCA1. *Nature* 382, 678-9.
- Chen, C. F., Li, S., Chen, Y., Chen, P. L., Sharp, Z. D. and Lee, W. H.** (1996). The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 271, 32863-8.
- Chen, J., Silver, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M. et al.** (1998a). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 2, 317-28.
- Chen, J., Silver, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M. et al.** (1998b). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 2, 317-28.
- Chen, J., Hedman, M. Z., Arver, B. W., Sigurdsson, S., Eyfjord, J. E. and Lindblom, A.** (1998c). BRCA2 germline mutations in Swedish breast cancer families. *Eur J Hum Genet* 6, 134-9.
- Chen, F. M., Hou, M. F., Chang, M. Y., Wang, J. Y., Hsieh, J. S., Ou-Yang, F., Huang, T. J. and Lin, S. R.** (2005). High frequency of somatic missense mutation of BRCA2 in female breast cancer from Taiwan. *Cancer Lett* 220, 177-84.
- Claes, K., Poppe, B., Coene, I., Paepe, A. D. and Messiaen, L.** (2004). BRCA1 and BRCA2 germline mutation spectrum and frequencies in Belgian breast/ovarian cancer families. *Br J Cancer* 90, 1244-51.
- Claus, E. B., Risch, N. and Thompson, W. D.** (1991). Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 48, 232-42.
- Clavel-Chapelon, F.** (2002). Differential effects of reproductive factors on the risk of pre- and postmenopausal breast cancer. Results from a large cohort of French women. *Br J Cancer* 86, 723-7.
- Cleton-Jansen, A. M., Collins, N., Lakhani, S. R., Weissenbach, J., Devilee, P., Cornelisse, C. J. and Stratton, M. R.** (1995). Loss of heterozygosity in sporadic breast tumours at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13. *Br J Cancer* 72, 1241-4.
- Collins, N., Wooster, R. and Stratton, M. R.** (1997). Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Cancer* 76, 1150-6.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S. J.** (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286, 1162-6.
- Couch, F. J., Farid, L. M., DeShano, M. L., Tavtigian, S. V., Calzone, K., Campeau, L., Peng, Y., Bogden, B., Chen, Q., Neuhausen, S. et al.** (1996). BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 13, 123-5.
- Couch, F. J., DeShano, M. L., Blackwood, M. A., Calzone, K., Stopfer, J., Campeau, L., Ganguly, A., Rebbeck, T. and Weber, B. L.** (1997). BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 336, 1409-15.
-

Crook, T., Brooks, L. A., Crossland, S., Osin, P., Barker, K. T., Waller, J., Philp, E., Smith, P. D., Yulug, I., Peto, J. et al. (1998). p53 mutation with frequent novel condons but not a mutator phenotype in BRCA1- and BRCA2-associated breast tumours. *Oncogene* 17, 1681-9.

Csokay, B., Udvarhelyi, N., Sulyok, Z., Besznyak, I., Ramus, S., Ponder, B. and Olah, E. (1999). High frequency of germ-line BRCA2 mutations among Hungarian male breast cancer patients without family history. *Cancer Res* 59, 995-8.

D

D'Andrea, A. D. and Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3, 23-34.

Dagan, E., Friedman, E., Paperna, T., Carmi, N. and Gershoni-Baruch, R. (2002). Androgen receptor CAG repeat length in Jewish Israeli women who are BRCA1/2 mutation carriers: association with breast/ovarian cancer phenotype. *Eur J Hum Genet* 10, 724-8.

Davies, J. F., Redmond, E. K., Cox, M. C., Laloo, F. I., Elles, R. and Evans, D. G. (2000). 2157delG: a frequent mutation in BRCA2 missed by PTT. *J Med Genet* 37, E42.

De la Hoya, M., Osorio, A., Godino, J., Sulleiro, S., Tosar, A., Perez-Segura, P., Fernandez, C., Rodriguez, R., Diaz-Rubio, E., Benitez, J. et al. (2002). Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and cancer phenotype in Spanish breast/ovarian cancer families: implications for genetic testing. *Int J Cancer* 97, 466-71.

De la Hoya, M., Diez, O., Perez-Segura, P., Godino, J., Fernandez, J. M., Sanz, J., Alonso, C., Baiget, M., Diaz-Rubio, E. and Caldes, T. (2003). Pre-test prediction models of BRCA1 or BRCA2 mutation in breast/ovarian families attending familial cancer clinics. *J Med Genet* 40, 503-10.

De Leon Matsuda, M. L., Liede, A., Kwan, E., Mapua, C. A., Cutiongco, E. M., Tan, A., Borg, A. and Narod, S. A. (2002). BRCA1 and BRCA2 mutations among breast cancer patients from the Philippines. *Int J Cancer* 98, 596-603.

De Sanjosé, S., Leone, M., Berez, V., Izquierdo, A., Font, R., Brunet, J. M., Louat, T., Vilardell, L., Borrás, J., Viladiu, P. et al. (2003). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. *Int J Cancer* 106, 588-93.

Den Dunnen, J. T. and Antonarakis, S. E. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15, 7-12.

Diez, O., Osorio, A., Robledo, M., Barroso, A., Domenech, M., Cortes, J., Albertos, J., Sanz, J., Brunet, J., SanRoman, J. M. et al. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Jewish mutations in Spanish breast cancer patients. *Br J Cancer* 79, 1302-3.

Du, Q., Luo, L., von Wachenfeldt, A., Kockum, I., Luthman, H. and Lindblom, A. (2002). No evidence for a familial breast cancer susceptibility gene at chromosome 13q21 in Swedish breast cancer families. *Int J Cancer* 98, 799-800.

Duarte, F., Cameselle-Teijeiro, J. F., Soares, R., Seixas, C., Cortizo-Torres, M. E., Perez-Villanueva, J. and Schmitt, F. C. (2002). [Analysis of mutations in genes BRCA1 and BRCA2 among patients with breast and ovarian cancer in northern Portugal and Galicia]. *Rev Clin Esp* 202, 259-63.

Dunning, A. M., Healey, C. S., Pharoah, P. D., Teare, M. D., Ponder, B. A. and Easton, D. F. (1999). A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 843-54.

E

Easton, D. F. (1994). Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 66, S177-82.

Easton, D. F., Steele, L., Fields, P., Ormiston, W., Averill, D., Daly, P. A., McManus, R., Neuhausen, S. L., Ford, D., Wooster, R. et al. (1997). Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet* 61, 120-8.

EIshamy, W. M. and Livingston, D. M. (2004). Identification of BRCA1-IRIS, a BRCA1 locus product. *Nat Cell Biol* 6, 954-67.

Emi, M., Matsushima, M., Katagiri, T., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Yokota, T., Nakata, T., Miki, Y. and Nakamura, Y. (1998). Multiplex mutation screening of the BRCA1 gene in 1000 Japanese breast cancers. *Jpn J Cancer Res* 89, 12-6.

Eng, C. (1998). Genetics of Cowden syndrome: through the looking glass of oncology. *Int J Oncol* 12, 701-10.

Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M. and West, S. C. (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434, 598-604.

Esteller, M., Silva, J. M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I. C., Repasky, E. A. et al. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92, 564-9.

Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y. J., Ramus, S. et al. (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10, 3001-7.

Evans, D. G., Bulman, M., Young, K., Gokhale, D. and Laloo, F. (2001). High detection rate for BRCA2 mutations in male breast cancer families from North West England. *Fam Cancer* 1, 131-3.

Evans, D. G., Neuhausen, S. L., Bulman, M., Young, K., Gokhale, D. and Laloo, F. (2004). Haplotype and cancer risk analysis of two common mutations, BRCA1 4184del4 and BRCA2 2157delG, in high risk northwest England breast/ovarian families. *J Med Genet* 41, e21.

F

Fackenthal, J. D., Cartegni, L., Krainer, A. R. and Olopade, O. I. (2002). BRCA2 T2722R is a deleterious allele that causes exon skipping. *Am J Hum Genet* 71, 625-31.

Fan, S., Wang, J., Yuan, R., Ma, Y., Meng, Q., Erdos, M. R., Pestell, R. G., Yuan, F., Auburn, K. J., Goldberg, I. D. et al. (1999). BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 284, 1354-6.

Fan, S., Yuan, R., Ma, Y. X., Meng, Q., Goldberg, I. D. and Rosen, E. M. (2001). Mutant BRCA1 genes antagonize phenotype of wild-type BRCA1. *Oncogene* 20, 8215-35.

FitzGerald, M. G., Bean, J. M., Hegde, S. R., Unsal, H., MacDonald, D. J., Harkin, D. P., Finkelstein, D. M., Isselbacher, K. J. and Haber, D. A. (1997). Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nat Genet* 15, 307-10.

Fleming, M. A., Potter, J. D., Ramirez, C. J., Ostrander, G. K. and Ostrander, E. A. (2003). Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: an evolutionary approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1151-6.

Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A. and Goldgar, D. E. (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 343, 692-5.

Ford, D., Easton, D. F. and Peto, J. (1995). Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet* 57, 1457-62.

Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D. T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J. et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 62, 676-89.

Foster, K. A., Harrington, P., Kerr, J., Russell, P., DiCioccio, R. A., Scott, I. V., Jacobs, I., Chenevix-Trench, G., Ponder, B. A. and Gayther, S. A. (1996). Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* 56, 3622-5.

Foulkes, W. D., Stefansson, I. M., Chappuis, P. O., Begin, L. R., Goffin, J. R., Wong, N., Trudel, M. and Akslen, L. A. (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 1482-5.

Frank, T. S., Manley, S. A., Olopade, O. I., Cummings, S., Garber, J. E., Bernhardt, B., Antman, K., Russo, D., Wood, M. E., Mullineau, L. et al. (1998). Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol* 16, 2417-25.

Frank, T. S., Deffenbaugh, A. M., Reid, J. E., Hulick, M., Ward, B. E., Lingenfelter, B., Gumper, K. L., Scholl, T., Tavtigian, S. V., Pruss, D. R. et al. (2002). Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 20, 1480-90.

Fricker, J. P., Muller, D., Cutuli, B., Rodier, J. F., Janser, J. C., Jung, G. M., Mors, R., Petit, T., Haeghele, P. and Abecassis, J. (2000). [Germ-line mutations of the BRCA1 gene in northeastern France]. *Bull Cancer* 87, 739-44.

Friedman, L. S., Gayther, S. A., Kurosaki, T., Gordon, D., Noble, B., Casey, G., Ponder, B. A. and Anton-Culver, H. (1997). Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet* 60, 313-9.

Fuks, F., Milner, J. and Kouzarides, T. (1998). BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* 17, 2531-4.

G

Gad, S., Caux-Moncoutier, V., Pages-Berhouet, S., Gauthier-Villars, M., Coupier, I., Pujol, P., Frenay, M., Gilbert, B., Maugard, C., Bignon, Y. J. et al. (2002). Significant contribution of large BRCA1 gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families. *Oncogene* 21, 6841-7.

Gail, M. H., Brinton, L. A., Byar, D. P., Corle, D. K., Green, S. B., Schairer, C. and Mulvihill, J. J. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81, 1879-86.

Gallardo, M., Silva, A., Rubio, L., Alvarez, C., Torrealba, C., Salinas, M., Tapia, T., Faundez, P., Palma, L., Riccio, M. E. et al. (2006). Incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in 54 Chilean families with breast/ovarian cancer, genotype-phenotype correlations. *Breast Cancer Res Treat* 95, 81-7.

Ganesan, S., Silver, D. P., Greenberg, R. A., Avni, D., Drapkin, R., Miron, A., Mok, S. C., Randrianarison, V., Brodie, S., Salstrom, J. et al. (2002). BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 111, 393-405.

Gao, Q., Neuhausen, S., Cummings, S., Luce, M. and Olopade, O. I. (1997). Recurrent germ-line BRCA1 mutations in extended African American families with early-onset breast cancer. *Am J Hum Genet* 60, 1233-6.

Gao, Q., Tomlinson, G., Das, S., Cummings, S., Sveen, L., Fackenthal, J., Schumm, P. and Olopade, O. I. (2000). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among clinic-based African American families with breast cancer. *Hum Genet* 107, 186-91.

Garber, J. E., Goldstein, A. M., Kantor, A. F., Dreyfus, M. G., Fraumeni, J. F., Jr. and Li, F. P. (1991). Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* 51, 6094-7.

Garcia-Patiño, E., Gomendio, B., Provencio, M., Silva, J. M., Garcia, J. M., Espana, P. and Bonilla, F. (1998). Germ-line BRCA1 mutations in women with sporadic breast cancer: clinical correlations. *J Clin Oncol* 16, 115-20.

Gayther, S. A., Warren, W., Mazoyer, S., Russell, P. A., Harrington, P. A., Chiano, M., Seal, S., Hamoudi, R., van Rensburg, E. J., Dunning, A. M. et al. (1995). Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet* 11, 428-33.

Gayther, S. A., Mangion, J., Russell, P., Seal, S., Barfoot, R., Ponder, B. A., Stratton, M. R. and Easton, D. (1997a). Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet* 15, 103-5.

- Gayther, S. A., Harrington, P., Russell, P., Kharkevich, G., Garkavtseva, R. F. and Ponder, B. A.** (1997b). Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia. *Am J Hum Genet* 60, 1239-42.
- Geisler, J. P., Hatterman-Zogg, M. A., Rathe, J. A. and Buller, R. E.** (2002). Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 94, 61-7.
- Gentile, M., Olsen, K., Dufmats, M. and Wingren, S.** (1999). Frequent allelic losses at 11q24.1-q25 in young women with breast cancer: association with poor survival. *Br J Cancer* 80, 843-9.
- Geoffroy-Perez, B., Janin, N., Ossian, K., Lauge, A., Croquette, M. F., Griscelli, C., Debre, M., Bressac-de-Paillerets, B., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D. et al.** (2001). Cancer risk in heterozygotes for ataxia-telangiectasia. *Int J Cancer* 93, 288-93.
- Giguere, Y., Dewailly, E., Brisson, J., Ayotte, P., Laflamme, N., Demers, A., Forest, V. I., Dodin, S., Robert, J. and Rousseau, F.** (2001). Short polyglutamine tracts in the androgen receptor are protective against breast cancer in the general population. *Cancer Res* 61, 5869-74.
- Goldgar, D. E., Easton, D. F., Deffenbaugh, A. M., Monteiro, A. N., Tavtigian, S. V. and Couch, F. J.** (2004). Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 75, 535-44.
- Gomendio, B., Silva, J. M., Garcia, J. M., Provencio, M., Espana, P. and Bonilla, F.** (1999). Low incidence of germline BRCA2 gene mutations among Spanish breast cancer patients. *Oncology* 57, 173-4.
- Gonzalez, R., Silva, J. M., Dominguez, G., Garcia, J. M., Martinez, G., Vargas, J., Provencio, M., Espana, P. and Bonilla, F.** (1999). Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* 81, 503-9.
- Gorski, B., Byrski, T., Huzarski, T., Jakubowska, A., Menkiszak, J., Gronwald, J., Pluzanska, A., Bebenek, M., Fischer-Maliszewska, L., Grzybowska, E. et al.** (2000). Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 66, 1963-8.
- Gorski, B., Debniak, T., Masojc, B., Mierzejewski, M., Medrek, K., Cybulski, C., Jakubowska, A., Kurzawski, G., Chosia, M., Scott, R. et al.** (2003). Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int J Cancer* 106, 379-81.
- Gorski, B., Jakubowska, A., Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Grzybowska, E., Mackiewicz, A., Stawicka, M., Bebenek, M., Sorokin, D. et al.** (2004). A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer* 110, 683-6.
- Grushko, T. A., Dignam, J. J., Das, S., Blackwood, A. M., Perou, C. M., Ridderstrale, K. K., Anderson, K. N., Wei, M. J., Adams, A. J., Hagos, F. G. et al.** (2004). MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res* 10, 499-507.
- Gudas, J. M., Nguyen, H., Li, T. and Cowan, K. H.** (1995). Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 55, 4561-5.

Gudas, J. M., Li, T., Nguyen, H., Jensen, D., Rauscher, F. J., 3rd and Cowan, K. H. (1996). Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth Differ* 7, 717-23.

Gutiérrez Enríquez, S., Díez, O., Cornet, M., Simón, M., Domènech, M., Sanz, J., Ramón y Cajal, T., Alonso, C. and Baiget, M. (2005). Large genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer families. *Eur J Hum Genet* 13 (Supp 1), 207.

H

Haffty, B. G., Silber, A., Matloff, E., Chung, J. and Lannin, D. (2006). Racial differences in the incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in a cohort of early onset breast cancer patients: African American compared to white women. *J Med Genet* 43, 133-7.

Hakansson, S., Johannsson, O., Johannsson, U., Sellberg, G., Loman, N., Gerdes, A. M., Holmberg, E., Dahl, N., Pandis, N., Kristoffersson, U. et al. (1997). Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 60, 1068-78.

Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B. and King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-9.

Hanby, A. M., Kelsell, D. P., Potts, H. W., Gillett, C. E., Bishop, D. T., Spurr, N. K. and Barnes, D. M. (2000). Association between loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 and morphological attributes of sporadic breast cancer. *Int J Cancer* 88, 204-8.

Hartge, P., Struewing, J. P., Wacholder, S., Brody, L. C. and Tucker, M. A. (1999). The prevalence of common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 64, 963-70.

Hartmann, C., John, A. L., Klaes, R., Hofmann, W., Bielen, R., Koehler, R., Janssen, B., Bartram, C. R., Arnold, N. and Zschocke, J. (2004). Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Hum Mutat* 24, 534.

Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H. and Ohta, T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 276, 14537-40.

Hayes, F., Cayan, C., Barilla, D. and Monteiro, A. N. (2000). Functional assay for BRCA1: mutagenesis of the COOH-terminal region reveals critical residues for transcription activation. *Cancer Res* 60, 2411-8.

Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Kallioniemi, O. P. et al. (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 344, 539-48.

Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Gordon, G. B., Longcope, C., Bush, T. L., Hoffman, S. C. and Comstock, G. W. (1995). Serum gonadotropins and steroid hormones and the development of ovarian cancer. *Jama* 274, 1926-30.

Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P. et al. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391, 184-7.

Hilton, J. L., Geisler, J. P., Rathe, J. A., Hattermann-Zogg, M. A., DeYoung, B. and Buller, R. E. (2002). Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 94, 1396-406.

Hogervorst, F. B., Nederlof, P. M., Gille, J. J., McElgunn, C. J., Grippeling, M., Pruntel, R., Regnerus, R., van Welsem, T., van Spaendonk, R., Menko, F. H. et al. (2003). Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res* 63, 1449-53.

Holt, J. T., Thompson, M. E., Szabo, C., Robinson-Benion, C., Arteaga, C. L., King, M. C. and Jensen, R. A. (1996). Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet* 12, 298-302.

Honrado, E., Benitez, J. and Palacios, J. (2005). The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 18, 1305-20.

Hopper, J. L., Southey, M. C., Dite, G. S., Jolley, D. J., Giles, G. G., McCredie, M. R., Easton, D. F. and Venter, D. J. (1999). Population-based estimate of the average age-specific cumulative risk of breast cancer for a defined set of protein-truncating mutations in BRCA1 and BRCA2. Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 741-7.

Hornreich, G., Beller, U., Lavie, O., Renbaum, P., Cohen, Y. and Levy-Lahad, E. (1999). Is uterine serous papillary carcinoma a BRCA1-related disease? Case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 75, 300-4.

Huber, L. J., Yang, T. W., Sarkisian, C. J., Master, S. R., Deng, C. X. and Chodosh, L. A. (2001). Impaired DNA damage response in cells expressing an exon 11-deleted murine Brca1 variant that localizes to nuclear foci. *Mol Cell Biol* 21, 4005-15.

Hughes-Davies, L., Huntsman, D., Ruas, M., Fuks, F., Bye, J., Chin, S. F., Milner, J., Brown, L. A., Hsu, F., Gilks, B. et al. (2003). EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell* 115, 523-35.

I

Izatt, L., Greenman, J., Hodgson, S., Ellis, D., Watts, S., Scott, G., Jacobs, C., Liebmann, R., Zvelebil, M. J., Mathew, C. et al. (1999). Identification of germline missense mutations and rare allelic variants in the ATM gene in early-onset breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26, 286-94.

J

- Janatova, M., Zikan, M., Dunder, P., Matous, B. and Pohlreich, P.** (2005). Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. *Hum Mutat* 25, 319.
- Jazaeri, A. A., Yee, C. J., Sotiriou, C., Brantley, K. R., Boyd, J. and Liu, E. T.** (2002). Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst* 94, 990-1000.
- Jenne, D. E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W. and Zimmer, M.** (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 18, 38-43.
- Jensen, R. A., Thompson, M. E., Jetton, T. L., Szabo, C. I., van der Meer, R., Helou, B., Tronick, S. R., Page, D. L., King, M. C. and Holt, J. T.** (1996). BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin. *Nat Genet* 12, 303-8.
- Johannsson, O., Ostermeyer, E. A., Hakansson, S., Friedman, L. S., Johannsson, U., Sellberg, G., Brondum-Nielsen, K., Sele, V., Olsson, H., King, M. C. et al.** (1996). Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden. *Am J Hum Genet* 58, 441-50.
- Johannsson, O., Loman, N., Moller, T., Kristoffersson, U., Borg, A. and Olsson, H.** (1999). Incidence of malignant tumours in relatives of BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. *Eur J Cancer* 35, 1248-57.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B.** (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-28.

K

- Kadouri, L., Kote-Jarai, Z., Easton, D. F., Hubert, A., Hamoudi, R., Glaser, B., Abeliovich, D., Peretz, T. and Eeles, R. A.** (2004). Polyglutamine repeat length in the AIB1 gene modifies breast cancer susceptibility in BRCA1 carriers. *Int J Cancer* 108, 399-403.
- Kainu, T., Juo, S. H., Desper, R., Schaffer, A. A., Gillanders, E., Rozenblum, E., Freas-Lutz, D., Weaver, D., Stephan, D., Bailey-Wilson, J. et al.** (2000). Somatic deletions in hereditary breast cancers implicate 13q21 as a putative novel breast cancer susceptibility locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9603-8.
- Katagiri, T., Emi, M., Ito, I., Kobayashi, K., Yoshimoto, M., Iwase, T., Kasumi, F., Miki, Y., Skolnick, M. H. and Nakamura, Y.** (1996). Mutations in the BRCA1 gene in Japanese breast cancer patients. *Hum Mutat* 7, 334-9.
- Kennedy, R. D., Quinn, J. E., Mullan, P. B., Johnston, P. G. and Harkin, D. P.** (2004). The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 96, 1659-68.
- Khoo, U. S., Ozcelik, H., Cheung, A. N., Chow, L. W., Ngan, H. Y., Done, S. J., Liang, A. C., Chan, V. W., Au, G. K., Ng, W. F. et al.** (1999). Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene* 18, 4643-6.

Kiechle, M., Gross, E., Schwarz-Boeger, U., Pfisterer, J., Jonat, W., Gerber, W. D., Albacht, B., Fischer, B., Schlegelberger, B. and Arnold, N. (2000). Ten novel BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and/or ovarian cancer families from northern Germany. *Hum Mutat* 16, 529-30.

King, M. C., Marks, J. H. and Mandell, J. B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302, 643-6.

Knudson, A. G. (1997). Karmofsky Memorial Lecture. Hereditary cancer: theme and variations. *J Clin Oncol* 15, 3280-7.

Koonin, E. V., Altschul, S. F. and Bork, P. (1996). BRCA1 protein products ... Functional motifs. *Nat Genet* 13, 266-8.

Krontiris, T. G., Devlin, B., Karp, D. D., Robert, N. J. and Risch, N. (1993). An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med* 329, 517-23.

Kuo, M. H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E. and Allis, C. D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* 12, 627-39.

Kwiatkowska, E., Teresiak, M., Breborowicz, D. and Mackiewicz, A. (2002). Somatic mutations in the BRCA2 gene and high frequency of allelic loss of BRCA2 in sporadic male breast cancer. *Int J Cancer* 98, 943-5.

L

Ladopoulos, A., Kroupis, C., Konstantopoulou, I., Ioannidou-Mouzaka, L., Schofield, A. C., Pantazidis, A., Armaou, S., Tsiagas, I., Lianidou, E., Efstathiou, E. et al. (2002). Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. *Cancer Lett* 185, 61-70.

Lakhani, S. R., Jacquemier, J., Sloane, J. P., Gusterson, B. A., Anderson, T. J., van de Vijver, M. J., Farid, L. M., Venter, D., Antoniou, A., Storer-Isser, A. et al. (1998). Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 90, 1138-45.

Lakhani, S. R., Van De Vijver, M. J., Jacquemier, J., Anderson, T. J., Osin, P. P., McGuffog, L. and Easton, D. F. (2002). The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 20, 2310-8.

Laloo, F., Varley, J., Ellis, D., Moran, A., O'Dair, L., Pharoah, P. and Evans, D. G. (2003). Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet* 361, 1101-2.

Lane, T. F., Deng, C., Elson, A., Lyu, M. S., Kozak, C. A. and Leder, P. (1995). Expression of Brca1 is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice. *Genes Dev* 9, 2712-22.

- Larson, J. S., Tonkinson, J. L. and Lai, M. T.** (1997). A BRCA1 mutant alters G2-M cell cycle control in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 57, 3351-5.
- Laskie-Ostrow, K., DiCioccio, R. A., McGuire, V. and Whittemore, A. S.** (2001). A BRCA1 variant, IVS23+1G-->A, causes abnormal RNA splicing by deleting exon 23. *Cancer Genet Cytogenet* 127, 188-90.
- Lee, H., Trainer, A. H., Friedman, L. S., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Ponder, B. A. and Venkitaraman, A. R.** (1999). Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol Cell* 4, 1-10.
- Lee, J. S., Collins, K. M., Brown, A. L., Lee, C. H. and Chung, J. H.** (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404, 201-4.
- Leegte, B., van der Hout, A. H., Deffenbaugh, A. M., Bakker, M. K., Mulder, I. M., ten Berge, A., Leenders, E. P., Wesseling, J., de Hullu, J., Hoogerbrugge, N. et al.** (2005). Phenotypic expression of double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2 germline mutations. *J Med Genet* 42, e20.
- Lefebvre, P., Mouchon, A., Lefebvre, B. and Formstecher, P.** (1998). Binding of retinoic acid receptor heterodimers to DNA. A role for histones NH2 termini. *J Biol Chem* 273, 12288-95.
- Levine, D. A. and Boyd, J.** (2001a). The androgen receptor and genetic susceptibility to ovarian cancer: results from a case series. *Cancer Res* 61, 908-11.
- Levine, D. A., Lin, O., Barakat, R. R., Robson, M. E., McDermott, D., Cohen, L., Satagopan, J., Offit, K. and Boyd, J.** (2001b). Risk of endometrial carcinoma associated with BRCA mutation. *Gynecol Oncol* 80, 395-8.
- Levy-Lahad, E., Catane, R., Eisenberg, S., Kaufman, B., Hornreich, G., Lishinsky, E., Shohat, M., Weber, B. L., Beller, U., Lahad, A. et al.** (1997). Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 60, 1059-67.
- Levy-Lahad, E., Lahad, A., Eisenberg, S., Dagan, E., Paperna, T., Kasinetz, L., Catane, R., Kaufman, B., Beller, U., Renbaum, P. et al.** (2001). A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3232-6.
- Liede, A., Cohen, B., Black, D. M., Davidson, R. H., Renwick, A., Hoodfar, E., Olopade, O. I., Micek, M., Anderson, V., De Mey, R. et al.** (2000). Evidence of a founder BRCA1 mutation in Scotland. *Br J Cancer* 82, 705-11.
- Liede, A., Malik, I. A., Aziz, Z., Rios Pd Pde, L., Kwan, E. and Narod, S. A.** (2002). Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to breast and ovarian cancer in Pakistan. *Am J Hum Genet* 71, 595-606.
- Lin, H. R., Ting, N. S., Qin, J. and Lee, W. H.** (2003). M phase-specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex. *J Biol Chem* 278, 35979-87.

Liu, H. X., Cartegni, L., Zhang, M. Q. and Krainer, A. R. (2001). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 27, 55-8.

Llort, G., Munoz, C. Y., Tuser, M. P., Guillermo, I. B., Lluch, J. R., Bale, A. E. and Franco, M. A. (2002). Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mutat* 19, 307.

Loman, N., Johannsson, O., Kristoffersson, U., Olsson, H. and Borg, A. (2001). Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93, 1215-23.

Long, H. J. (2004). Identification of germline 185delAG BRCA1 mutations in non-Jewish Americans of Spanish ancestry from the San Luis Valley, Colorado. *Cancer* 100, 434-5.

Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. and Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-9.

Lovelock, P. K., Healey, S., Au, W., Sum, E. Y., Tesoriero, A., Wong, E. M., Hinson, S., Brinkworth, R., Bekessy, A., Diez, O. et al. (2006). Genetic, functional, and histopathological evaluation of two C-terminal BRCA1 missense variants. *J Med Genet* 43, 74-83.

Lynch, H. T., Fain, P. R., Golgar, D., Albano, W. A., Mailliard, J. A. and McKenna, P. (1981). Familial breast cancer and its recognition in an oncology clinic. *Cancer* 47, 2730-9.

M

MacLachlan, T. K., Takimoto, R. and El-Deiry, W. S. (2002). BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets. *Mol Cell Biol* 22, 4280-92.

Malone, K. E., Daling, J. R., Neal, C., Suter, N. M., O'Brien, C., Cushing-Haugen, K., Jonasdottir, T. J., Thompson, J. D. and Ostrander, E. A. (2000). Frequency of BRCA1/BRCA2 mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases. *Cancer* 88, 1393-402.

Manguoglu, A. E., Luleci, G., Ozcelik, T., Colak, T., Schayek, H., Akaydin, M. and Friedman, E. (2003). Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat* 21, 444-5.

Mann, G. J., Thorne, H., Balleine, R. L., Butow, P. N., Clarke, C. L., Edkins, E., Evans, G. M., Fereday, S., Haan, E., Gattas, M. et al. (2006). Analysis of cancer risk and BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence in the kConFab familial breast cancer resource. *Breast Cancer Res* 8, R12.

Marcus, J. N., Watson, P., Page, D. L., Narod, S. A., Lenoir, G. M., Tonin, P., Linder-Stephenson, L., Salerno, G., Conway, T. A. and Lynch, H. T. (1996). Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* 77, 697-709.

- Marks, J. R., Huper, G., Vaughn, J. P., Davis, P. L., Norris, J., McDonnell, D. P., Wiseman, R. W., Futreal, P. A. and Iglehart, J. D. (1997). BRCA1 expression is not directly responsive to estrogen. *Oncogene* 14, 115-21.
- Marmorstein, L. Y., Ouchi, T. and Aaronson, S. A. (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13869-74.
- Marmorstein, L. Y., Kinev, A. V., Chan, G. K., Bochar, D. A., Beniya, H., Epstein, J. A., Yen, T. J. and Shiekhhattar, R. (2001). A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* 104, 247-57.
- Marsh, D. J., Coulon, V., Lunetta, K. L., Rocca-Serra, P., Dahia, P. L., Zheng, Z., Liaw, D., Caron, S., Duboue, B., Lin, A. Y. et al. (1998). Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 7, 507-15.
- Martínez Bouzas, C., Beristain Mendizabal, E., Guerra Merino, I., Gorostiaga Ayastuy, J., Mendizabal Urizar, J. L., de Pablo Lozano, J. L., García Alegría, E., Sanz Parra, A. and Tajada Mínguez, M. I. (2005). Presencia de la mutación 1100delC del gen CHEK2 en población vasca con cáncer de mama familiar. *Clin Trans Oncol* 7, 126.
- Martinez-Ferrandis, J. I., Vega, A., Chirivella, I., Marin-Garcia, P., Insa, A., Lluch, A., Carracedo, A., Chaves, F. J., Garcia-Conde, J., Cervantes, A. et al. (2003). Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in Mediterranean Spanish women with early-onset breast cancer: identification of three novel pathogenic mutations. *Hum Mutat* 22, 417-8.
- Mazoyer, S., Dunning, A. M., Serova, O., Dearden, J., Puget, N., Healey, C. S., Gayther, S. A., Mangion, J., Stratton, M. R., Lynch, H. T. et al. (1996). A polymorphic stop codon in BRCA2. *Nat Genet* 14, 253-4.
- Mazoyer, S., Puget, N., Perrin-Vidoz, L., Lynch, H. T., Serova-Sinilnikova, O. M. and Lenoir, G. M. (1998). A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *Am J Hum Genet* 62, 713-5.
- Mazoyer, S. (2005). Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 25, 415-22.
- Meijers-Heijboer, H., van den Ouweland, A., Klijn, J., Wasielewski, M., de Snoo, A., Oldenburg, R., Hollestelle, A., Houben, M., Crepin, E., van Veghel-Plandsoen, M. et al. (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 31, 55-9.
- Meindl, A. (2002). Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *Int J Cancer* 97, 472-80.
- Merajver, S. D., Pham, T. M., Caduff, R. F., Chen, M., Poy, E. L., Cooney, K. A., Weber, B. L., Collins, F. S., Johnston, C. and Frank, T. S. (1995). Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours. *Nat Genet* 9, 439-43.
- Meyer, P., Voigtlaender, T., Bartram, C. R. and Klaes, R. (2003). Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany. *Hum Mutat* 22, 259.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.

Miller, M. P. and Kumar, S. (2001). Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Hum Mol Genet* 10, 2319-28.

Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltsmann, M. and Kouzarides, T. (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 386, 772-3.

Mirkovic, N., Marti-Renom, M. A., Weber, B. L., Sali, A. and Monteiro, A. N. (2004). Structure-based assessment of missense mutations in human BRCA1: implications for breast and ovarian cancer predisposition. *Cancer Res* 64, 3790-7.

Modan, B., Hartge, P., Hirsh-Yechezkel, G., Chetrit, A., Lubin, F., Beller, U., Ben-Baruch, G., Fishman, A., Menczer, J., Ebbers, S. M. et al. (2001). Parity, oral contraceptives, and the risk of ovarian cancer among carriers and noncarriers of a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 345, 235-40.

Montagna, M., Dalla Palma, M., Menin, C., Agata, S., De Nicolo, A., Chieco-Bianchi, L. and D'Andrea, E. (2003). Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 12, 1055-61.

Monteiro, A. N., August, A. and Hanafusa, H. (1996). Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13595-9.

Monteiro, A. N., August, A. and Hanafusa, H. (1997). Common BRCA1 variants and transcriptional activation. *Am J Hum Genet* 61, 761-2.

Monteiro, A. N. and Humphrey, J. S. (1998). Yeast-based assays for detection and characterization of mutations in BRCA1. *Breast Dis* 10, 61-70.

Moynahan, M. E., Pierce, A. J. and Jasin, M. (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 7, 263-72.

Mullineaux, L. G., Castellano, T. M., Shaw, J., Axell, L., Wood, M. E., Diab, S., Klein, C., Sitarik, M., Deffenbaugh, A. M. and Graw, S. L. (2003). Identification of germline 185delAG BRCA1 mutations in non-Jewish Americans of Spanish ancestry from the San Luis Valley, Colorado. *Cancer* 98, 597-602.

N

Nagy, R., Sweet, K. and Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 23, 6445-70.

Nanda, R., Schumm, L. P., Cummings, S., Fackenthal, J. D., Sveen, L., Ademuyiwa, F., Cobleigh, M., Esserman, L., Lindor, N. M., Neuhausen, S. L. et al. (2005). Genetic testing in an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry. *Jama* 294, 1925-33.

- Narod, S. A.** (2002). Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 113-23.
- Nathanson, K. L. and Weber, B. L.** (2001). "Other" breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet* 10, 715-20.
- Neuhausen, S. L., Mazoyer, S., Friedman, L., Stratton, M., Offit, K., Caligo, A., Tomlinson, G., Cannon-Albright, L., Bishop, T., Kelsell, D. et al.** (1996). Haplotype and phenotype analysis of six recurrent BRCA1 mutations in 61 families: results of an international study. *Am J Hum Genet* 58, 271-80.
- Neuhausen, S. L., Godwin, A. K., Gershoni-Baruch, R., Schubert, E., Garber, J., Stoppa-Lyonnet, D., Olah, E., Csokay, B., Serova, O., Lalloo, F. et al.** (1998). Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet* 62, 1381-8.
- Neuhausen, S. L.** (1999). Ethnic differences in cancer risk resulting from genetic variation. *Cancer* 86, 2575-82.
- Newman, B., Austin, M. A., Lee, M. and King, M. C.** (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3044-8.
- Noruzinia, M., Coupier, I. and Pujol, P.** (2005). Is BRCA1/BRCA2-related breast carcinogenesis estrogen dependent? *Cancer* 104, 1567-74.

O

- Oddoux, C., Struewing, J. P., Clayton, C. M., Neuhausen, S., Brody, L. C., Kaback, M., Haas, B., Norton, L., Borgen, P., Jhanwar, S. et al.** (1996). The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat Genet* 14, 188-90.
- Offit, K., Gilewski, T., McGuire, P., Schluger, A., Hampel, H., Brown, K., Swensen, J., Neuhausen, S., Skolnick, M., Norton, L. et al.** (1996). Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *Lancet* 347, 1643-5.
- Offit, K., Levran, O., Mullaney, B., Mah, K., Nafa, K., Batish, S. D., Diotti, R., Schneider, H., Deffenbaugh, A., Scholl, T. et al.** (2003). Shared genetic susceptibility to breast cancer, brain tumors, and Fanconi anemia. *J Natl Cancer Inst* 95, 1548-51.
- Olsen, J. H., Hahnemann, J. M., Borresen-Dale, A. L., Brondum-Nielsen, K., Hammarstrom, L., Kleinerman, R., Kaariainen, H., Lonnqvist, T., Sankila, R., Seersholm, N. et al.** (2001). Cancer in patients with ataxia-telangiectasia and in their relatives in the nordic countries. *J Natl Cancer Inst* 93, 121-7.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T.** (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2766-70.

Osorio, A., Robledo, M., Albertos, J., Diez, O., Alonso, C., Baiget, M. and Benitez, J. (1998). Molecular analysis of the six most recurrent mutations in the BRCA1 gene in 87 Spanish breast/ovarian cancer families. *Cancer Lett* 123, 153-8.

Osorio, A., Barroso, A., Martinez, B., Cebrian, A., San Roman, J. M., Lobo, F., Robledo, M. and Benitez, J. (2000). Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer* 82, 1266-70.

Osorio, A., de la Hoya, M., Rodriguez-Lopez, R., Martinez-Ramirez, A., Cazorla, A., Granizo, J. J., Esteller, M., Rivas, C., Caldes, T. and Benitez, J. (2002). Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int J Cancer* 99, 305-9.

Osorio, A., Rodriguez-Lopez, R., Diez, O., de la Hoya, M., Ignacio Martinez, J., Vega, A., Esteban-Cardenosa, E., Alonso, C., Caldes, T. and Benitez, J. (2004). The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the CHEK2 gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer* 108, 54-6.

Osorio, A., Martinez-Delgado, B., Pollan, M., Cuadros, M., Urioste, M., Torrenteras, C., Melchor, L., Diez, O., De La Hoya, M., Velasco, E. et al. (2006). A haplotype containing the p53 polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro modifies cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *Hum Mutat* 27, 242-8.

Ottini, L., D'Amico, C., Noviello, C., Lauro, S., Lalle, M., Fornarini, G., Colantuoni, O. A., Pizzi, C., Cortesi, E., Carlini, S. et al. (2000). BRCA1 and BRCA2 mutations in central and southern Italian patients. *Breast Cancer Res* 2, 307-10.

Ottini, L., Masala, G., D'Amico, C., Mancini, B., Saieva, C., Aceto, G., Gestri, D., Vezzosi, V., Falchetti, M., De Marco, M. et al. (2003). BRCA1 and BRCA2 mutation status and tumor characteristics in male breast cancer: a population-based study in Italy. *Cancer Res* 63, 342-7.

P

Pagani, F., Buratti, E., Stuani, C., Bendix, R., Dork, T. and Baralle, F. E. (2002). A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nat Genet* 30, 426-9.

Palacios, J., Honrado, E., Osorio, A., Cazorla, A., Sarrio, D., Barroso, A., Rodriguez, S., Cigudosa, J. C., Diez, O., Alonso, C. et al. (2003). Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin Cancer Res* 9, 3606-14.

Pao, G. M., Janknecht, R., Ruffner, H., Hunter, T. and Verma, I. M. (2000). CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1020-5.

Papelard, H., de Bock, G. H., van Eijk, R., Vliet Vlieland, T. P., Cornelisse, C. J., Devilee, P. and Tollenaar, R. A. (2000). Prevalence of BRCA1 in a hospital-based population of Dutch breast cancer patients. *Br J Cancer* 83, 719-24.

- Park, J. J., Irvine, R. A., Buchanan, G., Koh, S. S., Park, J. M., Tilley, W. D., Stallcup, M. R., Press, M. F. and Coetzee, G. A.** (2000). Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor. *Cancer Res* 60, 5946-9.
- Parmigiani, G., Berry, D. and Aguilar, O.** (1998). Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 62, 145-58.
- Peelen, T., van Vliet, M., Petrij-Bosch, A., Mieremet, R., Szabo, C., van den Ouweland, A. M., Hogervorst, F., Brohet, R., Ligtenberg, M. J., Teugels, E. et al.** (1997). A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 60, 1041-9.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A. et al.** (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52.
- Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G. M. and Mazoyer, S.** (2002). The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 11, 2805-14.
- Peto, J., Easton, D. F., Matthews, F. E., Ford, D. and Swerdlow, A. J.** (1996). Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS Study. Office of Population Censuses and Surveys. *Int J Cancer* 65, 275-83.
- Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton, D. F., Evans, C., Deacon, J. and Stratton, M. R.** (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 943-9.
- Peto, J.** (2002). Breast cancer susceptibility-A new look at an old model. *Cancer Cell* 1, 411-2.
- Petrij-Bosch, A., Peelen, T., van Vliet, M., van Eijk, R., Olmer, R., Drusedau, M., Hogervorst, F. B., Hageman, S., Arts, P. J., Ligtenberg, M. J. et al.** (1997). BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 17, 341-5.
- Pharoah, P. D., Antoniou, A., Bobrow, M., Zimmern, R. L., Easton, D. F. and Ponder, B. A.** (2002). Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 31, 33-6.
- Phelan, C. M., Rebbeck, T. R., Weber, B. L., Devilee, P., Ruttledge, M. H., Lynch, H. T., Lenoir, G. M., Stratton, M. R., Easton, D. F., Ponder, B. A. et al.** (1996). Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nat Genet* 12, 309-11.
- Phelan, C. M., Dapic, V., Tice, B., Favis, R., Kwan, E., Barany, F., Manoukian, S., Radice, P., van der Luijt, R. B., van Nesselrooij, B. P. et al.** (2005). Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J Med Genet* 42, 138-46.
- Puget, N., Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Audouy, C., Pages, S., Lynch, H. T., Goldgar, D., Lenoir, G. M. and Mazoyer, S.** (1999). An Alu-mediated 6-kb duplication in the BRCA1 gene: a new founder mutation? *Am J Hum Genet* 64, 300-2.

R

Rahman, N., Teare, M. D., Seal, S., Renard, H., Mangion, J., Cour, C., Thompson, D., Shugart, Y., Eccles, D., Devilee, P. et al. (2000). Absence of evidence for a familial breast cancer susceptibility gene at chromosome 8p12-p22. *Oncogene* 19, 4170-3.

Rajan, J. V., Marquis, S. T., Gardner, H. P. and Chodosh, L. A. (1997). Developmental expression of Brca2 colocalizes with Brca1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues. *Dev Biol* 184, 385-401.

Rebbeck, T. R., Kantoff, P. W., Krithivas, K., Neuhausen, S., Blackwood, M. A., Godwin, A. K., Daly, M. B., Narod, S. A., Garber, J. E., Lynch, H. T. et al. (1999). Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am J Hum Genet* 64, 1371-7.

Rebbeck, T. R., Wang, Y., Kantoff, P. W., Krithivas, K., Neuhausen, S. L., Godwin, A. K., Daly, M. B., Narod, S. A., Brunet, J. S., Vesprini, D. et al. (2001). Modification of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer risk by AIB1 genotype and reproductive history. *Cancer Res* 61, 5420-4.

Reeves, M. D., Yawitch, T. M., van der Merwe, N. C., van den Berg, H. J., Dreyer, G. and van Rensburg, E. J. (2004). BRCA1 mutations in South African breast and/or ovarian cancer families: evidence of a novel founder mutation in Afrikaner families. *Int J Cancer* 110, 677-82.

Rice, J. C., Ozcelik, H., Maxeiner, P., Andrusis, I. and Futscher, B. W. (2000). Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 21, 1761-5.

Risch, H. A., McLaughlin, J. R., Cole, D. E., Rosen, B., Bradley, L., Kwan, E., Jack, E., Vesprini, D. J., Kuperstein, G., Abrahamson, J. L. et al. (2001). Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 68, 700-10.

Rodriguez-Lopez, R., Osorio, A., Ribas, G., Pollan, M., Sanchez-Pulido, L., de la Hoya, M., Ruibal, A., Zamora, P., Arias, J. I., Salazar, R. et al. (2004). The variant E233G of the RAD51D gene could be a low-penetrance allele in high-risk breast cancer families without BRCA1/2 mutations. *Int J Cancer* 110, 845-9.

Ruffner, H. and Verma, I. M. (1997). BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7138-43.

Ruffner, H., Jiang, W., Craig, A. G., Hunter, T. and Verma, I. M. (1999). BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. *Mol Cell Biol* 19, 4843-54.

Ruffner, H., Joazeiro, C. A., Hemmati, D., Hunter, T. and Verma, I. M. (2001). Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5134-9.

S

- Salas, A., Comas, D., Lareu, M. V., Bertranpetit, J. and Carracedo, A.** (1998). mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur J Hum Genet* 6, 365-75.
- Salazar, R., Cruz-Hernandez, J. J., Sanchez-Valdivieso, E., Rodriguez, C. A., Gomez-Bernal, A., Barco, E., Fonseca, E., Portugal, T. and Gonzalez-Sarmiento, R.** (2006). BRCA1-2 mutations in breast cancer: identification of nine new variants of BRCA1-2 genes in a population from central Western Spain. *Cancer Lett* 233, 172-7.
- Salgado, J., Zabalegui, N., Garcia-Amigot, F., Gil, M. C., Gonzalez, M. S. and Garcia-Foncillas, J.** (2005). Structure-based assessment of BRCA1 and BRCA2 mutations in a small Spanish population. *Oncol Rep* 14, 85-8.
- Santarosa, M., Dolcetti, R., Magri, M. D., Crivellari, D., Tibiletti, M. G., Gallo, A., Tumolo, S., Della Puppa, L., Furlan, D., Boiocchi, M. et al.** (1999). BRCA1 and BRCA2 genes: role in hereditary breast and ovarian cancer in Italy. *Int J Cancer* 83, 5-9.
- Santarosa, M. and Ashworth, A.** (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654, 105-22.
- Sarantaus, L., Huusko, P., Eerola, H., Launonen, V., Vehmanen, P., Rapakko, K., Gillanders, E., Syrjakoski, K., Kainu, T., Vahteristo, P. et al.** (2000). Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. *Eur J Hum Genet* 8, 757-63.
- Sarkisian, C. J., Master, S. R., Huber, L. J., Ha, S. I. and Chodosh, L. A.** (2001). Analysis of murine Brca2 reveals conservation of protein-protein interactions but differences in nuclear localization signals. *J Biol Chem* 276, 37640-8.
- Saurin, A. J., Borden, K. L., Boddy, M. N. and Freemont, P. S.** (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 21, 208-14.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S. et al.** (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268, 1749-53.
- Schmutzler, R. K., Bierhoff, E., Werkhausen, T., Fimmers, R., Speiser, P., Kubista, E., Krebs, D., Zeillinger, R., Wiestler, O. D. and Von Deimling, A.** (1997). Genomic deletions in the BRCA1, BRCA2 and TP53 regions associate with low expression of the estrogen receptor in sporadic breast carcinoma. *Int J Cancer* 74, 322-5.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F. and Pals, G.** (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30, e57.
- Schumacher, V., Vogel, T., Leube, B., Driemel, C., Goecke, T., Moslein, G. and Royer-Pokora, B.** (2005). STK11 genotyping and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 42, 428-35.

- Scully, R., Chen, J., Ochs, R. L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J. and Livingston, D. M.** (1997a). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90, 425-35.
- Scully, R., Anderson, S. F., Chao, D. M., Wei, W., Ye, L., Young, R. A., Livingston, D. M. and Parvin, J. D.** (1997b). BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5605-10.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. and Livingston, D. M.** (1997c). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-75.
- Scully, R. and Livingston, D. M.** (2000). In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408, 429-32.
- Seitz, S., Rohde, K., Bender, E., Nothnagel, A., Kolble, K., Schlag, P. M. and Scherneck, S.** (1997a). Strong indication for a breast cancer susceptibility gene on chromosome 8p12-p22: linkage analysis in German breast cancer families. *Oncogene* 14, 741-3.
- Seitz, S., Rohde, K., Bender, E., Nothnagel, A., Pidde, H., Ullrich, O. M., El-Zehairy, A., Haensch, W., Jandrig, B., Kolble, K. et al.** (1997b). Deletion mapping and linkage analysis provide strong indication for the involvement of the human chromosome region 8p12-p22 in breast carcinogenesis. *Br J Cancer* 76, 983-91.
- Serova, O. M., Mazoyer, S., Puget, N., Dubois, V., Tonin, P., Shugart, Y. Y., Goldgar, D., Narod, S. A., Lynch, H. T. and Lenoir, G. M.** (1997). Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet* 60, 486-95.
- Shafman, T. D., Levitz, S., Nixon, A. J., Gibans, L. A., Nichols, K. E., Bell, D. W., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Gelman, R., Garber, J. et al.** (2000). Prevalence of germline truncating mutations in ATM in women with a second breast cancer after radiation therapy for a contralateral tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 124-9.
- Shapiro, M. B. and Senapathy, P.** (1987). RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 15, 7155-74.
- Sharan, S. K., Wims, M. and Bradley, A.** (1995). Murine Brca1: sequence and significance for human missense mutations. *Hum Mol Genet* 4, 2275-8.
- Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. and Bradley, A.** (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 386, 804-10.
- Siddique, H., Zou, J. P., Rao, V. N. and Reddy, E. S.** (1998). The BRCA2 is a histone acetyltransferase. *Oncogene* 16, 2283-5.
- Sidransky, D., Tokino, T., Helzlsouer, K., Zehnauer, B., Rausch, G., Shelton, B., Prestigiacomo, L., Vogelstein, B. and Davidson, N.** (1992). Inherited p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res* 52, 2984-6.
- Simard, J., Tonin, P., Durocher, F., Morgan, K., Rommens, J., Gingras, S., Samson, C., Leblanc, J. F., Belanger, C., Dion, F. et al.** (1994). Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet* 8, 392-8.

-
- Slattery, M. L. and Kerber, R. A.** (1993). A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. The Utah Population Database. *Jama* 270, 1563-8.
- Smith, T. M., Lee, M. K., Szabo, C. I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L. and King, M. C.** (1996). Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 6, 1029-49.
- Snouwaert, J. N., Gowen, L. C., Latour, A. M., Mohn, A. R., Xiao, A., DiBiase, L. and Koller, B. H.** (1999). BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. *Oncogene* 18, 7900-7.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S. et al.** (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-74.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S. et al.** (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8418-23.
- Spain, B. H., Larson, C. J., Shihabuddin, L. S., Gage, F. H. and Verma, I. M.** (1999). Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13920-5.
- Spillman, M. A. and Bowcock, A. M.** (1996). BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen. *Oncogene* 13, 1639-45.
- Spurdle, A. B., Dite, G. S., Chen, X., Mayne, C. J., Southey, M. C., Batten, L. E., Chy, H., Trute, L., McCredie, M. R., Giles, G. G. et al.** (1999). Androgen receptor exon 1 CAG repeat length and breast cancer in women before age forty years. *J Natl Cancer Inst* 91, 961-6.
- Staff, S., Isola, J. J., Johannsson, O., Borg, A. and Tanner, M. M.** (2001). Frequent somatic loss of BRCA1 in breast tumours from BRCA2 germ-line mutation carriers and vice versa. *Br J Cancer* 85, 1201-5.
- Staff, S., Isola, J. and Tanner, M.** (2003). Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 63, 4978-83.
- Starita, L. M. and Parvin, J. D.** (2003). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* 15, 345-50.
- Stratton, M. R., Ford, D., Neuhasen, S., Seal, S., Wooster, R., Friedman, L. S., King, M. C., Egilsson, V., Devilee, P., McManus, R. et al.** (1994). Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. *Nat Genet* 7, 103-7.
- Struewing, J. P., Brody, L. C., Erdos, M. R., Kase, R. G., Giambarresi, T. R., Smith, S. A., Collins, F. S. and Tucker, M. A.** (1995). Detection of eight BRCA1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families, including 1 family with male breast cancer. *Am J Hum Genet* 57, 1-7.
-

Struewing, J. P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S. M., Berlin, M., McAdams, M., Timmerman, M. M., Brody, L. C. and Tucker, M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 336, 1401-8.

Struewing, J. P., Coriaty, Z. M., Ron, E., Livoff, A., Konichezky, M., Cohen, P., Resnick, M. B., Lifzchiz-Mercerl, B., Lew, S. and Iscovich, J. (1999). Founder BRCA1/2 mutations among male patients with breast cancer in Israel. *Am J Hum Genet* 65, 1800-2.

Stuppia, L., Di Fulvio, P., Aceto, G., Pintor, S., Veschi, S., Gatta, V., Colosimo, A., Cianchetti, E., Cama, A., Mariani-Costantini, R. et al. (2003). BRCA1 and BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer patients from central Italy. *Hum Mutat* 22, 178-9.

Swift, M., Reitnauer, P. J., Morrell, D. and Chase, C. L. (1987). Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 316, 1289-94.

Syrjakoski, K., Vahteristo, P., Eerola, H., Tamminen, A., Kivinummi, K., Sarantaus, L., Holli, K., Blomqvist, C., Kallioniemi, O. P., Kainu, T. et al. (2000). Population-based study of BRCA1 and BRCA2 mutations in 1035 unselected Finnish breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 92, 1529-31.

Szabo, C. I., Wagner, L. A., Francisco, L. V., Roach, J. C., Argonza, R., King, M. C. and Ostrander, E. A. (1996). Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence comparison among species. *Hum Mol Genet* 5, 1289-98.

Szabo, C. I. and King, M. C. (1997). Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 60, 1013-20.

T

Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D. et al. (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 12, 333-7.

The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group. The exon 13 duplication in the BRCA1 gene is a founder mutation present in geographically diverse populations. (2000). *Am J Hum Genet* 67, 207-12.

Thompson, D. and Easton, D. (2001). Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 68, 410-9.

Thompson, D., Szabo, C. I., Mangion, J., Oldenburg, R. A., Odefrey, F., Seal, S., Barfoot, R., Kroeze-Jansema, K., Teare, D., Rahman, N. et al. (2002a). Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 827-31.

Thompson, D. and Easton, D. F. (2002b). Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 94, 1358-65.

- Thompson, T. E. and Easton, D.** (2002c). Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 329-36.
- Thompson, D., Easton, D. F. and Goldgar, D. E.** (2003). A full-likelihood method for the evaluation of causality of sequence variants from family data. *Am J Hum Genet* 73, 652-5.
- Thompson, D. and Easton, D.** (2004). The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 221-36.
- Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J., McGuffog, L., Last, J., Reiman, A., Byrd, P., Taylor, M. and Easton, D. F.** (2005). Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 97, 813-22.
- Thorlacius, S., Tryggvadottir, L., Olafsdottir, G. H., Jonasson, J. G., Ogmundsdottir, H. M., Tulinius, H. and Eyfjord, J. E.** (1995). Linkage to BRCA2 region in hereditary male breast cancer. *Lancet* 346, 544-5.
- Thorlacius, S., Olafsdottir, G., Tryggvadottir, L., Neuhausen, S., Jonasson, J. G., Tavtigian, S. V., Tulinius, H., Ogmundsdottir, H. M. and Eyfjord, J. E.** (1996). A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 13, 117-9.
- Thorlacius, S., Sigurdsson, S., Bjarnadottir, H., Olafsdottir, G., Jonasson, J. G., Tryggvadottir, L., Tulinius, H. and Eyfjord, J. E.** (1997). Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am J Hum Genet* 60, 1079-84.
- Tirkkonen, M., Johannsson, O., Agnarsson, B. A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., Tanner, M., Isola, J., Barkardottir, R. B., Borg, A. et al.** (1997). Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res* 57, 1222-7.
- Tonin, P., Weber, B., Offit, K., Couch, F., Rebbeck, T. R., Neuhausen, S., Godwin, A. K., Daly, M., Wagner-Costalos, J., Berman, D. et al.** (1996). Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med* 2, 1179-83.
- Tonin, P. M., Mes-Masson, A. M., Narod, S. A., Ghadirian, P. and Provencher, D.** (1999). Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian ovarian cancer cases unselected for family history. *Clin Genet* 55, 318-24.
- Tonin, P. N., Perret, C., Lambert, J. A., Paradis, A. J., Kantemiroff, T., Benoit, M. H., Martin, G., Foulkes, W. D. and Ghadirian, P.** (2001). Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in early-onset French Canadian breast cancer cases unselected for family history. *Int J Cancer* 95, 189-93.
- Tournier, I., Paillet, B. B., Sobol, H., Stoppa-Lyonnet, D., Lidereau, R., Barrois, M., Mazoyer, S., Coulet, F., Hardouin, A., Chompret, A. et al.** (2004). Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. *Cancer Res* 64, 8143-7.
- Tryggvadottir, L., Olafsdottir, E. J., Gudlaugsdottir, S., Thorlacius, S., Jonasson, J. G., Tulinius, H. and Eyfjord, J. E.** (2003). BRCA2 mutation carriers, reproductive factors and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 5, R121-8.
- Turner, N., Tutt, A. and Ashworth, A.** (2004). Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4, 814-9.

Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J. and Ashworth, A. (2001). Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo J* 20, 4704-16.

U

Unger, M. A., Nathanson, K. L., Calzone, K., Antin-Ozerkis, D., Shih, H. A., Martin, A. M., Lenoir, G. M., Mazoyer, S. and Weber, B. L. (2000). Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am J Hum Genet* 67, 841-50.

V

Vahteristo, P., Bartkova, J., Eerola, H., Syrjakoski, K., Ojala, S., Kilpivaara, O., Tamminen, A., Kononen, J., Aittomaki, K., Heikkila, P. et al. (2002). A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 71, 432-8.

Vallon-Christersson, J., Cayanan, C., Haraldsson, K., Loman, N., Bergthorsson, J. T., Brondum-Nielsen, K., Gerdes, A. M., Moller, P., Kristoffersson, U., Olsson, H. et al. (2001). Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 10, 353-60.

Van Asperen, C. J., Brohet, R. M., Meijers-Heijboer, E. J., Hoogerbrugge, N., Verhoef, S., Vasen, H. F., Ausems, M. G., Menko, F. H., Gomez Garcia, E. B., Klijn, J. G. et al. (2005). Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. *J Med Genet* 42, 711-9.

Van Der Looij, M., Szabo, C., Besznyak, I., Liszka, G., Csokay, B., Pulay, T., Toth, J., Devilee, P., King, M. C. and Olah, E. (2000a). Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer* 86, 737-40.

Van der Looij, M., Cleton-Jansen, A. M., van Eijk, R., Morreau, H., van Vliet, M., Kuipers-Dijkshoorn, N., Olah, E., Cornelisse, C. J. and Devilee, P. (2000b). A sporadic breast tumor with a somatically acquired complex genomic rearrangement in BRCA1. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 295-302.

Van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T. et al. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-6.

Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K. M., Chrzanowska, K. H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanova, E., Cooper, P. R., Nowak, N. J. et al. (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467-76.

Vega, A., Torres, M., Martinez, J. I., Ruiz-Ponte, C., Barros, F. and Carracedo, A. (2002). Analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast and breast/ovarian cancer families shows population substructure in the Iberian peninsula. *Ann Hum Genet* 66, 29-36.

Velasco Sampedro, E., Esteban Cardenosa, E., Infante Sanz, M., Duran Dominguez, M., Lastra Aras, E., Garcia Giron, C. and Miner Pino, C. (2002). Molecular study of the BRCA1 and BRCA2 genes in 153 breast cancer families from Castilla and Leon (Spain): new nine unclassified variants identified. *Med Clin (Barc)* 119, 441-5.

Verhoog, L. C., Brekelmans, C. T., Seynaeve, C., van den Bosch, L. M., Dahmen, G., van Geel, A. N., Tilanus-Linthorst, M. M., Bartels, C. C., Wagner, A., van den Ouweland, A. et al. (1998). Survival and tumour characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of BRCA1. *Lancet* 351, 316-21.

Verhoog, L. C., Brekelmans, C. T., Seynaeve, C., Dahmen, G., van Geel, A. N., Bartels, C. C., Tilanus-Linthorst, M. M., Wagner, A., Devilee, P., Halley, D. J. et al. (1999). Survival in hereditary breast cancer associated with germline mutations of BRCA2. *J Clin Oncol* 17, 3396-402.

Vink, G. R., van Asperen, C. J., Devilee, P., Breuning, M. H. and Bakker, E. (2005). Unclassified variants in disease-causing genes: nonuniformity of genetic testing and counselling, a proposal for guidelines. *Eur J Hum Genet* 13, 525-7.

Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-6.

W

Wagner, J. E., Tolar, J., Levrán, O., Scholl, T., Deffenbaugh, A., Satagopan, J., Ben-Porat, L., Mah, K., Batish, S. D., Kutler, D. I. et al. (2004). Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood* 103, 3226-9.

Walsh, T., Casadei, S., Coats, K. H., Swisher, E., Stray, S. M., Higgins, J., Roach, K. C., Mandell, J., Lee, M. K., Ciernikova, S. et al. (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Jama* 295, 1379-88.

Wang, H., Shao, N., Ding, Q. M., Cui, J., Reddy, E. S. and Rao, V. N. (1997). 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* 15, 143-57.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J. and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14, 927-39.

Wang, W. W., Spurdle, A. B., Kolachana, P., Bove, B., Modan, B., Ebbers, S. M., Suthers, G., Tucker, M. A., Kaufman, D. J., Doody, M. M. et al. (2001). A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 955-60.

- Weber, B. H., Brohm, M., Stec, I., Backe, J. and Caffier, H.** (1996). A somatic truncating mutation in BRCA2 in a sporadic breast tumor. *Am J Hum Genet* 59, 962-4.
- Weiss, J. R., Moysich, K. B. and Swede, H.** (2005). Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 20-6.
- Weitzel, J. N., Lagos, V., Blazer, K. R., Nelson, R., Ricker, C., Herzog, J., McGuire, C. and Neuhausen, S.** (2005). Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1666-71.
- Welcsh, P. L., Owens, K. N. and King, M. C.** (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 16, 69-74.
- Welcsh, P. L. and King, M. C.** (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10, 705-13.
- Wessels, L. F., van Welsem, T., Hart, A. A., van't Veer, L. J., Reinders, M. J. and Nederlof, P. M.** (2002). Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. *Cancer Res* 62, 7110-7.
- West, S. C.** (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 435-45.
- Whittemore, A. S., Harris, R. and Itnyre, J.** (1992). Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 136, 1184-203.
- Wilkening, S., Burwinkel, B., Grzybowska, E., Klaes, R., Pamula, J., Pekala, W., Zientek, H., Hemminki, K. and Forsti, A.** (2005). Polyglutamine repeat length in the NCOA3 does not affect risk in familial breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 291-2.
- Williams, W. R. and Anderson, D. E.** (1984). Genetic epidemiology of breast cancer: segregation analysis of 200 Danish pedigrees. *Genet Epidemiol* 1, 7-20.
- Wilson, C. A., Payton, M. N., Elliott, G. S., Buas, F. W., Cajulis, E. E., Grosshans, D., Ramos, L., Reese, D. M., Slamon, D. J. and Calzone, F. J.** (1997). Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-delta11b. *Oncogene* 14, 1-16.
- Wong, J., Patterton, D., Imhof, A., Guschin, D., Shi, Y. B. and Wolffe, A. P.** (1998). Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *Embo J* 17, 520-34.
- Woodward, A. M., Davis, T. A., Silva, A. G., Kirk, J. A. and Leary, J. A.** (2005). Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *J Med Genet* 42, e31.
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. et al.** (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265, 2088-90.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-92.

Wooster, R. and Weber, B. L. (2003). Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 2339-47.

Wu, L. C., Wang, Z. W., Tsan, J. T., Spillman, M. A., Phung, A., Xu, X. L., Yang, M. C., Hwang, L. Y., Bowcock, A. M. and Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 14, 430-40.

Wu, K., Jiang, S. W., Thangaraju, M., Wu, G. and Couch, F. J. (2000). Induction of the BRCA2 promoter by nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 275, 35548-56.

Wu, K., Hinson, S. R., Ohashi, A., Farrugia, D., Wendt, P., Tavtigian, S. V., Deffenbaugh, A., Goldgar, D. and Couch, F. J. (2005). Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants. *Cancer Res* 65, 417-26.

X

Xia, F., Taghian, D. G., DeFrank, J. S., Zeng, Z. C., Willers, H., Iliakis, G. and Powell, S. N. (2001). Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8644-9.

Xu, C. F., Chambers, J. A., Nicolai, H., Brown, M. A., Hujeirat, Y., Mohammed, S., Hodgson, S., Kelsell, D. P., Spurr, N. K., Bishop, D. T. et al. (1997). Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in UK breast/ovarian cancer families. *Genes Chromosomes Cancer* 18, 102-10.

Xu, B., Kim, S. and Kastan, M. B. (2001). Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21, 3445-50.

Xu, B., O'Donnell, A. H., Kim, S. T. and Kastan, M. B. (2002). Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* 62, 4588-91.

Y

Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H. and Pavletich, N. P. (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 297, 1837-48.

Yano, K., Morotomi, K., Saito, H., Kato, M., Matsuo, F. and Miki, Y. (2000). Nuclear localization signals of the BRCA2 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 171-5.

Yarden, R. I. and Brody, L. C. (1999). BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4983-8.

Yarden, R. I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K. H. and Brody, L. C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30, 285-9.

Ye, Q., Hu, Y. F., Zhong, H., Nye, A. C., Belmont, A. S. and Li, R. (2001). BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol* 155, 911-21.

Yoshida, K. and Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95, 866-71.

Yoshikawa, K., Honda, K., Inamoto, T., Shinohara, H., Yamauchi, A., Suga, K., Okuyama, T., Shimada, T., Kodama, H., Noguchi, S. et al. (1999). Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases. *Clin Cancer Res* 5, 1249-61.

Z

Zheng, L., Flesken-Nikitin, A., Chen, P. L. and Lee, W. H. (2002). Deficiency of Retinoblastoma gene in mouse embryonic stem cells leads to genetic instability. *Cancer Res* 62, 2498-502.