

Ανάπτυξη διαγνωστικής μεθόδου
για την ανάλυση του γονιδίου *BRCA1*
σε Ελληνικές οικογένειες
με ιστορικό καρκίνου μαστού-ωοθηκών*

Ε. Κωνσταντοπούλου,¹
Χ. Κρούπης,²
Α. Λαδοπούλου,¹
Α. Πανταζίδης,¹
Δ. Μπούμπα,¹
Ε. Λιανίδου,²
Μ. Petersen,³
Λ. Φλωρεντίν,⁴
Γ. Φούντζηλιας,^{5,6}
Δ. Γιαννουκάκος¹

ΣΚΟΠΟΣ της παρούσας μελέτης ήταν, αρχικά, η καταγραφή των κυριότερων μεταλλάξεων του γονιδίου *BRCA1* στον Ελληνικό πληθυσμό και, στη συνέχεια, ο σχεδιασμός διαγνωστικής μεθόδου για το χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων αυτών σε ασθενείς ή υγιή άτομα, που ανήκουν σε οικογένειες υψηλού κινδύνου για καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Αρχικά, απομονώθηκε γενομικό DNA ασθενών που ανήκουν σε οικογένειες με ιστορικό δύο ή περισσότερων περιπτώσεων καρκίνου του μαστού σε ηλικία μικρότερη των 50 ετών ή καρκίνου ωοθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας. Στη συνέχεια, αναλύθηκε το εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA1* με τη μέθοδο ταυτοποίησης θέσεων πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης (Protein Truncation Test, PTT). Τα υπόλοιπα εξόνια αναλύθηκαν με απευθείας ανάγνωση της αλληλουχίας τους. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Ταυτοποιήθηκαν 3 παθογόνες μεταλλάξεις, οι 3741insA, 1623del5-TTAAA και 3099delT, σε σύνολο 19 ασθενών. Σύμφωνα με τα στοιχεία της διεθνούς βάσης δεδομένων BIC, η πρώτη μετάλλαξη έχει καταγραφεί μόνο μία φορά σε μια Τουρκική οικογένεια στη Γερμανία, η δεύτερη έξι φορές και η τρίτη είναι μια νέα μετάλλαξη. Επίσης, ταυτοποιήθηκαν τρεις γνωστοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *BRCA1*, οι E1038G (exon 11), P871L (exon 11), S1613C (exon 16), μια γνωστή μετάλλαξη του εσονίου 18 (IVS18+ 65 G>A), καθώς και μια άλλη περιοχή στο εσόνιο 16 με δύο μεταλλάξεις (IVS16-68 G>A, IVS16-92 G>A), οι οποίες δεν κατηγοριοποιήθηκαν και δεν έχουν αναφερθεί. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Η πιλοτική αυτή μελέτη έδειξε ότι (α) παθογόνες μεταλλάξεις του γονιδίου *BRCA1* εντοπίζονται και στον Ελληνικό πληθυσμό, (β) γνωστοί πολυμορφισμοί του γονιδίου βρίσκονται και στον Ελληνικό πληθυσμό, (γ) ο συνδυασμός των μεθόδων PTT και αυτόματης ανάγνωσης της αλληλουχίας του DNA καθιστά δυνατή την ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων σε πολύ σύνθετα γονίδια με σχετικά χαμηλό κόστος και (δ) η μεθοδολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαγνωστικά σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου μαστού/ωοθηκών.

¹Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, Ι/Ρ-ΡΠ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

²Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

³Τμήμα Γενετικής, Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού

⁴Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής ΑλφαLab

⁵Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ

⁶Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα

Development of a diagnostic method for the detection of *BRCA1* mutations in breast/ovarian cancer families from Greece

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

BRCA1

Οικογενής καρκίνος μαστού, ωοθηκών

Β' Βραβείο
Έπαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης» 2000

* Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την οικονομική υποστήριξη της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ)

Έχειδειχθεί ότι τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο ποσοστό του οικογενή καρκίνου μαστού/ωοθηκών.¹⁻³ Οι φορείς των κληρονομούμενων μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά έχουν ιδιαίτερα αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών. Εκτιμάται ότι, στο γενικό πληθυσμό, 6–7% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού και 10% του καρκίνου των ωοθηκών οφείλονται σε μεταλλάξεις στα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο.⁴ Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων του *BRCA1* και *BRCA2* σε οικογένειες υψηλού κινδύνου για καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών (ή και των δύο) διαφέρει σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται.^{5,6} Η συχνότητα των μεταλλάξεων του *BRCA1* είναι 1,5–2,0 φορές υψηλότερη από τη συχνότητα των μεταλλάξεων του *BRCA2*. Οικογένειες υψηλού κινδύνου ορίζονται αυτές στις οποίες τουλάχιστον τρεις συγγενείς (γυναίκες) έχουν προσβληθεί από καρκίνο του μαστού ή εκείνες όπου τη νόσο έχουν εμφανίσει τουλάχιστον δύο συγγενείς, από τους οποίους η μία έχει προσβληθεί από καρκίνο των ωοθηκών ή έχει καταγραφεί ανδρικός καρκίνος του μαστού.

Στην έρευνα των Frank et al, η οποία πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ, το δείγμα των ασθενών που εξετάστηκαν διαμορφώθηκε με βάση τα παρακάτω κριτήρια: (α) η ηλικία εμφάνισης του καρκίνου του μαστού ήταν πριν τα 50 χρόνια, (β) στην οικογένεια υπήρχε τουλάχιστον μία συγγενής πρώτου ή δεύτερου βαθμού, η οποία είχε προσβληθεί από καρκίνο του μαστού σε ηλικία μικρότερη των 50 ετών ή (γ) στην οικογένεια υπήρχε τουλάχιστον μία συγγενής, η οποία είχε προσβληθεί από καρκίνο των ωοθηκών χωρίς ένδειξη ηλικίας. Εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* σε ποσοστό 45% των ασθενών (50 από 101), οι οποίες είχαν τουλάχιστον δύο συγγενείς που είχαν προσβληθεί από καρκίνο μαστού/ωοθηκών, και σε ποσοστό 22% (20 από 89) των ασθενών που είχαν μόνο ένα συγγενή με καρκίνο.⁷

Σε δύο άλλες μεγάλες κλινικές μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν στις ΗΠΑ τη διετία 1995–1996, όπου αποκλειστικό κριτήριο για την επιλογή του δείγματος ήταν η ηλικία εμφάνισης του καρκίνου, η οποία αναδείχθηκε σε παράγοντα πρόβλεψης μεταλλάξεων στο *BRCA1*, βρέθηκε ότι το 8% και το 10% των γυναικών ηλικίας κάτω των 35 και 30 ετών, αντίστοιχα, έφεραν κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου *BRCA1*.^{8,9} Σε μια άλλη πληθυσμιακή μελέτη στις ΗΠΑ αναφέρθηκε ότι, από 208 γυναίκες με καρκίνο του μαστού σε ηλικία μικρότερη των 45 ετών, με οικογε-

νειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, μόνο 15 (7%) έφεραν μεταλλάξεις του *BRCA1*.¹⁰ Σε αυτή τη μελέτη, το ποσοστό των μεταλλάξεων εξαρτάτο άμεσα από τη μικρή ηλικία των ασθενών με διάγνωση καρκίνου και από τον αριθμό διαγνώσεων καρκίνου μαστού/ωοθηκών στο οικογενειακό ιστορικό. Σε άλλη μελέτη, επίσης στις ΗΠΑ, αναφέρεται ότι μεταλλάξεις του *BRCA1* βρέθηκαν μόνο στο 3,3% (4 από 120) των γυναικών με διάγνωση καρκίνου του μαστού σε ηλικία από 20–74 ετών. Το οικογενειακό ιστορικό ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας πρόβλεψης των μεταλλάξεων του *BRCA1* και, πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των συγγενών που έχουν νοσήσει και η παρουσία καρκίνου των ωοθηκών σε μια συγγενή.¹¹

Από όλες τις παραπάνω πληθυσμιακές έρευνες συνάγεται ότι η παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2* σχετίζεται πρωτίστως με την προσβολή από καρκίνο μαστού/ωοθηκών άλλων μελών της οικογένειας (οικογενειακό ιστορικό). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μελών που έχουν προσβληθεί, τόσο περισσότερες είναι οι πιθανότητες για ύπαρξη μιας κληρονομούμενης μετάλλαξης του *BRCA1* ή *BRCA2*. Επίσης, στις οικογένειες αυτές, σημαντικός παράγοντας πρόβλεψης των μεταλλάξεων είναι η ηλικία εμφάνισης της νόσου. Όσο περισσότερα είναι τα μέλη στην οικογένεια που εμφάνισαν τη νόσο σε νεαρή ηλικία, τόσο περισσότερες είναι και οι πιθανότητες παρουσίας μεταλλάξεων.

Το γοκκατασταλτικό γονίδιο *BRCA1* αποτελείται από 22 κωδικοποιούμενα και 2 μη κωδικοποιούμενα εξόνια (πίν. 1)^{1,2} και συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου¹² και στον έλεγχο της επιδιόρθωσης του DNA.^{13,14} Περισσότερες από 300 μεταλλάξεις του *BRCA1* έχουν καταγραφεί παγκοσμίως και καλύπτουν σχεδόν όλο το μήκος της κωδικοποιούμενης περιοχής. Όλες οι καταγεγραμμένες μεταλλάξεις του *BRCA1* είναι κληρονομικές και περίπου το 85% αυτών έχουν ως αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης (nonsense, frameshift mutations). Σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα δημοσιευμένες εργασίες, το 60% των μεταλλάξεων εντοπίζονται στο εξόνιο 11 και περίπου το 20% στα εξόνια 2, 5 και 20.

Το ποσοστό των οικογενειών υψηλού κινδύνου με καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών, που αποδίδεται σε μεταλλάξεις του *BRCA1*, διαφέρει σημαντικά από τον έναν πληθυσμό στον άλλο.^{5,6} Μεταλλάξεις του *BRCA1* είναι εξαιρετικά συχνές στη Ρωσία (ανέρχονται στο 79% των οικογενειών υψηλού κινδύνου).¹⁵⁻¹⁷ Το πλέον συχνό αλληλόμορφο στη Ρωσία είναι το 5382insC, το οποίο

Πίνακας 1. Ειδικόι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers), που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα PCR και ανάγνωσης της αλληλουχίας του γονιδίου *BRCA1*.

| Όνομασία | Πρόσθιος (forward) | Ανάστροφος (reverse) | Μέγεθος τελικού προϊόντος |
|------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| exon 2 | GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT | TGCTTTTCTTCCCTAGTATGT | 258 bp |
| exon 3 | AACGAACTTGAGGCCTTATG | TTGGATTTTCGTTCTCACTTA | 339 bp |
| exon 5 | CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG | ATGGTTTTATAGGAACGCTATG | 278 bp |
| exon 6 | TTTCTACTGTTGCTGCATCT | TAATTTGCAAACCTTCCTGAG | 326 bp |
| exon 7 | CACAACAAGAGCATACATAGGG | AGGAGCTGCTTCCCTAGCCTC | 353 bp |
| exon 8 | GCTGACTGATGATGGTCAATTT | TTCTTCAAGGTGGAACTGC | 268 bp |
| exon 9 | CCTGCCACAGTAGATGCT | ACACCAAATCCCAAGTCGTGTG | 333 bp |
| exon 10 | CCCAGCAACCATTTTCATTT | AAGGTCCCAAATGGTCTTCA | 241 bp |
| exon 11.1 | GGAATTAATGAAAGAGTATGAGC | CTCACACAGGGGATCAGCATTC | 548 bp |
| exon 11.2 | CAACATAACAGATGGGCTGGAAG | TCTGTGGCTCAGTAACAAATGCTC | 526 bp |
| exon 11.3 | GAAAACCTATCGGAAGAAGGCAAG | CGCATGAATATGCCTGGTAGAAG | 481 bp |
| exon 11.4 | AGGCTGAGGAGGAAGTCTTCTACC | TCTGTTTTGCTTCCCTAGAGTG | 563 bp |
| exon 11.5 | AAGTGTCTAATAATGCTGAAGACCCC | CATTCCTCTTCTGCATTTCTGG | 430 bp |
| exon 11.6 | GCCAGTCATTTGCTCCGTTTT | AATACTGGAGCCCCTTCATTAAGTAC | 578 bp |
| exon 11.7 | TCAATGTCACCTGAAAGAGAAATGG | GACGCTTTTGCTAAAAACAGCAG | 525 bp |
| exon 11.8 | GTTTGTCTGAGACACCTGATGACC | GTGATGTTCTGAGATGCCTTTG | 420 bp |
| exon 11.9 | CGTTGCTACCGAGTGTCTGTCTAAG | GTGCTCCCAAAAGCATAAA | 436 bp |
| exon 12 | GTCCTGCCAATGAGAAGAAA | TGTCAGCAAACCTAAGAAATGT | 265 bp |
| exon 13 | AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA | ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC | 320 bp |
| exon 14 | CTAACCTGAATTATCACTATCA | GTGTATAAATGCCTGTATGCA | 312 bp |
| exon 15 | TGGCTGCCCAGGAAGTATG | AACCAGAATATCTTTATGTAGGA | 338 bp |
| exon 16 | AATTCTTAACAGAGACCAGAAC | AAAACCTTTCCAGAATGTTG | 450 bp |
| exon 17 | GTGTAGAACGTGCAGGATTTG | TCGCTCATGTGGTTTTA | 263 bp |
| exon 18 | GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC | GAGACCATTTCCAGCATC | 352 bp |
| exon 19 | CTGTCAATCTTCTGTGCTC | CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC | 249 bp |
| exon 20–21 | GCTCCACCCTCCATTGAAG | GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT | 590 bp |
| exon 22 | TCCCATTGAGAGGTCTTGCT | GAGAAGACTTCTGAGGCTAC | 297 bp |
| exon 23 | CAGAGCAAGACCCTGTCTC | ACTGTGCTACTCAAGACCA | 255 bp |
| exon 24 | ATGAATTGACACTAATCTCTGC | GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA | 280 bp |

αντιστοιχεί στην πιο συχνή μετάλλαξη, που απαντά σε όλες τις Ευρωπαϊκές χώρες. Ως προς τη συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων του *BRCA1* σε άλλες χώρες, ακολουθεί το Ισραήλ, με ποσοστό 47% επί των οικογενειών υψηλού κινδύνου, και η Ιταλία, με ποσοστό 29%. Ενώ στο Ισραήλ παρατηρούνται δύο μόνο μεταλλάξεις (185delAG και 5382insC), στην Ιταλία σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις είναι μοναδικές. Στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες το ποσοστό παρουσίας των μεταλλάξεων κυμαίνεται από 15–25%, με εμφάνιση σημαντικής ετερογένειας στο είδος των μεταλλάξεων, ενώ σε διεθνές επίπεδο, από τα μέχρι σήμερα υπάρχοντα δεδομένα, τα χαμηλότερα ποσοστά σημειώνονται στην Ιαπωνία (10%).

Η παρατηρούμενη, λοιπόν, διαφορετικότητα στη γεωγραφική κατανομή των μεταλλάξεων αναδεικνύει την αναγκαιότητα για εθνικού τύπου μελέτες, έτσι ώστε

να καταγραφεί το φάσμα των μεταλλάξεων του γονιδίου αυτού και η συνακόλουθη γνώση να εξυπηρετήσει προληπτικούς και διαγνωστικούς σκοπούς.

Όσον αφορά τις Μεσογειακές χώρες, ολοκληρωμένες μελέτες έχουν γίνει μόνο στην Ιταλία,^{18–23} στη Γαλλία^{24–26} και στην Ισπανία.^{27–32} Στις τρεις αυτές χώρες, οι μεταλλάξεις εντοπίζονται σε όλο το μήκος της κωδικοποιούμενης περιοχής του γονιδίου και ιδιαίτερα στο εξόνιο 11.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μόνο δύο πρόσφατες (1999) πιλοτικές μελέτες, που αφορούν το χώρο των Βαλκανίων (Γιουγκοσλαβία³³ και Τουρκία³⁴). Στις δύο αυτές χώρες ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη 5382insC και τρεις επιπλέον μεταλλάξεις, στα εξόνια 2, 11 και 24.

Σ' αυτή την εργασία αναλύσαμε το γενομικό DNA 19 ασθενών Ελληνικής καταγωγής με ιστορικό καρκίνου

μαστού/ωοθηκών, χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανάλυσης πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης και την απευθείας ανάλυση της αλληλουχίας του DNA. Ταυτοποιήθηκαν 3 μεταλλάξεις στο εξόνιο 11, οι οποίες οδηγούν στην αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης. Η πρώτη έχει αναφερθεί μία μόνο φορά στη βάση δεδομένων BIC σε μια Τουρκική οικογένεια που ζει στη Γερμανία, η δεύτερη 6 φορές, ενώ η τρίτη είναι μια καινούρια μετάλλαξη.

Καμία από τις γνωστές ιδρυτικές μεταλλάξεις, 185delAG, C61G και 5382insC, δεν εντοπίστηκε μετά από απευθείας ανάλυση της αλληλουχίας των αντίστοιχων εξονίων (2, 5, 20) σε 22, 10 και 26, αντίστοιχα, ασθενείς που ανήκουν σε οικογένειες υψηλού κινδύνου.

Επίσης, ταυτοποιήθηκαν τρεις γνωστοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *BRCA1* [E1038G (exon 11), P871L (exon 11), S1613G (exon 16)], μία ήδη γνωστή μετάλλαξη του εσονίου 18 (IVS18+65 G>A), καθώς και μία περίπτωση μη κατηγοριοποιήσιμη, που φέρει δύο θέσεις μεταλλαγμένες στο εσόνιο 16 και δεν έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι παραπάνω παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται για πρώτη φορά στον Ελληνικό πληθυσμό. Καμία άλλη δεν έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι ασθενείς και οι οικογένειές τους

Σε συνεργασία με Ελληνικά νοσοκομεία έγινε συλλογή γενομικού DNA από ασθενείς που προέρχονταν από οικογένειες, στις οποίες δύο ή περισσότερα μέλη είχαν προσβληθεί από καρκίνο μαστού/ωοθηκών. Τα κριτήρια για τη διαμόρφωση του μελετούμενου δείγματος ήταν η ύπαρξη στην ίδια οικογένεια τουλάχιστον ενός μέλους με συγγένεια πρώτου ή δεύτερου βαθμού με καρκίνο μαστού/ωοθηκών σε ηλικία κάτω των 50 ετών ή η παρουσία καρκίνου των ωοθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας. Η επιλογή των ασθενών έγινε μετά από έγγραφη συγκατάθεσή τους για τη μελέτη. Το ιστορικό των διαφόρων οικογενειών αναφέρεται στον πίνακα 2.

Ανίχνευση των μεταλλάξεων

Το γενομικό DNA των ασθενών απομονώθηκε από περιφερικά λεμφοκύτταρα με χρήση των σπινών Qiagen. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κάλυπταν και τα 22 κωδικοποιούμενα εξόνια του γονιδίου, καθώς επίσης και τις περιοχές σύνδεσης εσονίων και εξονίων. Η επιλογή των εκκινητών έγινε εν μέρει από τη διεθνή βάση δεδομένων BIC, που υπάρχει στο Διαδίκτυο στη διεύθυνση http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic. Οι υπόλοιποι εκκινητές σχεδιάστηκαν ανάλογα με τις ανάγκες που προέκυπταν κατά τη διάρκεια της μελέτης (πίν. 1). Η αρίθμηση που χρησιμοποιείται

αναφέρεται στην αλληλουχία του cDNA του *BRCA1* με αριθμό πρόσβασης U1480 στη βάση δεδομένων GenBank.

Στη συνέχεια, το γενομικό DNA ενισχύθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε ένα θερμοκυκλοποιητή Perkin-Elmer 2400 (Perkin Elmer, CA, USA).

Ανάλυση πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Το εξόνιο 11 (3,6 kb) ενισχύεται σε τρία τμήματα παρουσία δύο εκκινητών (5' και 3'). Ο εκκινητής 5' περιέχει έναν προαγωγέα T7 και κατάλληλη αλληλουχία μεταγραφής και μετάφρασης.³⁵ Το προϊόν της ενίσχυσης υποβάλλεται σε αντίδραση μεταγραφής και μετάφρασης χρησιμοποιώντας το *in vitro* σύστημα δικτυοκυττάρου (Promega). Τα προϊόντα της μετάφρασης αναλύονται σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 12%, σταθεροποιούνται, στεγνώνονται και υποβάλλονται σε αυτοραδιογραφία.

Ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA

Η αλληλουχία των προϊόντων της PCR αναλύθηκε με χρήση των ίδιων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αρχική ενίσχυση. Στις περιπτώσεις όπου κρίθηκε απαραίτητο, αναλύθηκε η αλληλουχία και προς τις δύο κατευθύνσεις. Η ταυτοποίηση όλων των τύπων μεταλλάξεων, που περιγράφονται σε αυτή τη μελέτη, έγινε μετά από ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA και προς τις δύο κατευθύνσεις. Η ανάγνωση της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με το kit ABI PRISM DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing στο γενετικό αναλυτή ABI310 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η δυνατότητα ανάλυσης του συγκεκριμένου οργάνου είναι περίπου 10.000 βάσεις το 24ωρο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παθογόνες μεταλλάξεις

Αρχικά, απομονώθηκε γενομικό DNA από περιφερικά λεμφοκύτταρα 19 ασθενών με καρκίνο μαστού/ωοθηκών, σύμφωνα με τα κριτήρια εισόδου που αναφέρονται στο κεφάλαιο «Υλικό και μέθοδος» (πίν. 2). Η αρχική διαλογή έγινε με εφαρμογή της τεχνικής του ελέγχου για πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης (PTT) στο εξόνιο 11, το οποίο αντιπροσωπεύει περισσότερο από το μισό της κωδικοποιούμενης περιοχής του γονιδίου *BRCA1*. Στις περιπτώσεις όπου δεν παρατηρήθηκε πρόωρος τερματισμός της πρωτεϊνικής σύνθεσης, αναλύθηκαν τα εξόνια 2, 5 και 20 με απευθείας ανάγνωση της αλληλουχίας τους. Σε δέκα από τους ασθενείς έγινε ανάλυση όλων των υπολοίπων εξονίων με απευθείας ανάγνωση της αλληλουχίας τους. Η ανάλυση κατά PTT οδήγησε στην ταυτοποίηση

Πίνακας 2. Ασθενείς που ανήκαν σε οικογένειες υψηλού ή μέτριου κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών και των οποίων το γενομικό DNA αναλύθηκε για μεταλλάξεις στο γονίδιο.

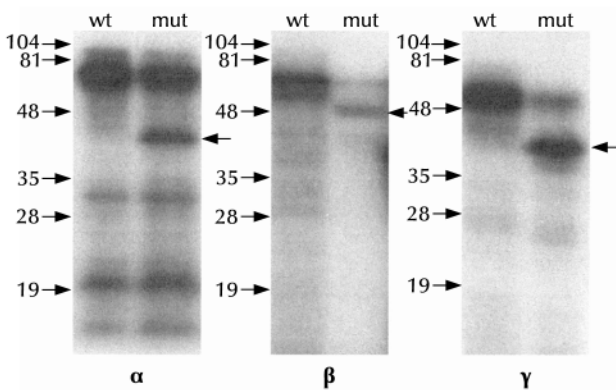
| Οικογένεια No | Περιπτώσεις καρκίνου μαστού | | Περιπτώσεις καρκίνου ωοθηκών | Μεταλλάξεις | Αποτέλεσμα | Σχόλια/ άλλοι τύποι καρκίνου |
|------------------|-----------------------------|--------------|---------------------------------|--|------------|---|
| | Σύνολο | <50 ετών | | | | |
| 1 | 2 | 2 (32 ετών)* | | IVS18+65 G>A | Άγνωστο | |
| 9 | 3 | 3 (45 ετών)* | | | | |
| 62 | 3 | 1 (32 ετών)* | | | | |
| 64 | 2 | 2 (31 ετών)* | | 3741insA | ter 1218 | Ένας αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού |
| 74 | 2 | 2 (31 ετών)* | | IVS18+65 G>A | Άγνωστο | Ένας αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού |
| 77 | 2 | | 1 | | | |
| 85 | 3 | 3 (36 ετών)* | | | | |
| 88 | 3 | 2 (48 ετών)* | | | | |
| 89 | 1 | | 1 | IVS18+65 G>A IVS16+68 G>A IVS16-92 G>A | Άγνωστο | Μία επιπλέον περίπτωση καρκίνου στομάχου |
| 90 | 1 | | 1 | | | |
| 97 | 2 | 1 (35 ετών)* | | | | |
| 98 | | 1 (31 ετών)* | 1 | 1623del5-TTAAA | ter 505 | Μία επιπλέον περίπτωση καρκίνου του ενδομητρίου |
| 99 | 1 | | 4 | 3099delT | ter 999 | Η μία περίπτωση είναι καρκίνος μαστού και ωοθηκών |
| 105 | 2 | 2 (28 ετών)* | | | | |
| 107 | 1 | 1 (40 ετών)* | | | | Ένας αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού |
| 113 | 3 | 2 (39 ετών)* | | | | |
| 114 | 3 | 1 (30 ετών)* | | | | Ιστορικό καρκίνου μαστού και από τους δύο γονείς |
| 118 | 2 | 2 (39 ετών)* | | | | Μία περίπτωση με δύο εστίες καρκίνου μαστού |
| 122 | 3 | | | | | Δίδυμος αδελφός με καρκίνο προστάτη |

* Ηλικία εμφάνισης της ασθενούς που συμπεριλήφθη στη μελέτη της νόσου

μικρότερων πρωτεϊνικών παραγώγων, που αντιστοιχούν σε διαφορετικές περιοχές του εξονίου 11 (A, B, Γ), στις οικογένειες 64, 98, 99 (εικ. 1). Ανάλυση της αλληλουχίας των περιοχών που πιθανόν περιείχαν μεταλλάξεις αποκάλυψε 3 μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν στην αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (πίν. 2, εικ. 2). Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονταν στην ομάδα των οικογενειών με βεβαρημένο ιατρικό ιστορικό ή σε συνδυασμό

με περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου μαστού/ωοθηκών σε νεαρή ηλικία. Και οι τρεις αυτές μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στο εξόνιο 11.

Η μετάλλαξη 3741insA προκαλεί πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης στο κωδικόνιο 1218 και βρέθηκε σε μία ασθενή με αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού σε ηλικία 31 ετών (οικογένεια 64), με μία μόνο συγγενή δεύτερου βαθμού με καρκίνο του μαστού



Εικόνα 1. Εντοπισμός των μεταλλάξεων με τη μέθοδο ανάλυσης πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης, που εφαρμόστηκε στο εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA1*. Τα πολυπεπίδια που συνθέτονται *in vitro* αντιτοικούν σε διαφορετικά τμήματα του εξονίου 11 (τμήμα α: νουκλεοτίδια 793–2125, τμήμα β: νουκλεοτίδια 1921–3383, τμήμα γ: νουκλεοτίδια 3061–4183). Μικρότερα πολυπεπίδια από τα φυσιολογικά, που προκύπτουν από τις μεταλλάξεις αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης, παρατηρήθηκαν στις οικογένειες 64 (α), 98 (β) και 99 (γ) και σημειώνονται με τα βέλη στα δεξιά των πλαισίων.

σε ηλικία 35 ετών. Η μετάλλαξη αυτή έχει αναφερθεί μόνο μία φορά στη βάση δεδομένων BIC, αλλά δεν έχει δημοσιευθεί πουθενά αλλού. Η οικογένεια στην οποία βρέθηκε είναι Τουρκικής καταγωγής και ζει στη Γερμανία.

Η μετάλλαξη 1623del5-TTAAA οδηγεί στον πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης στο κωδικόνιο 505. Η μετάλλαξη αυτή εντοπίστηκε σε μία ασθενή (οικογένεια 98), που ανέπτυξε καρκίνο των ωοθηκών. Στην ίδια οικογένεια υπήρχε μία περίπτωση καρκίνου του μαστού και μία άλλη με καρκίνο του ενδομητρίου. Η μετάλλαξη αυτή αναφέρθηκε αρχικά σε μια Βρετανική οικογένεια³⁶ και στη συνέχεια βρέθηκε και στην Ιταλία¹⁸ και την Ισπανία.³² Μέχρι το Φεβρουάριο του 2000 υπήρχαν 6 αναφορές γι' αυτή τη μετάλλαξη στη βάση δεδομένων BIC.

Η μετάλλαξη 3099delT είναι μια καινούρια μετάλλαξη, η οποία προκαλεί πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης στο κωδικόνιο 999. Ταυτοποιήθηκε σε μια ασθενή που ανέπτυξε καρκίνο των ωοθηκών σε ηλικία 33 ετών και είναι μέλος οικογένειας υψηλού κινδύνου (No 99), με δύο επιπλέον περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών και μία περίπτωση καρκίνου μαστού και ωοθηκών στην ίδια ασθενή. Και οι 4 ασθενείς ήταν συγγενείς πρώτου βαθμού. Για να ελεγχθεί εάν κάποια από τις τρεις αυτές μεταλλάξεις εμφανίζεται με ιδιαίτερη συχνότητα στον Ελληνικό πληθυσμό, αναλύθηκαν 15 επιπλέον ασθενείς με απευθείας ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA στα συγκεκριμένα αυτά σημεία του εξονίου

11. Καμία από τις ανωτέρω ασθενείς δεν έφερε τις παραπάνω μεταλλάξεις. Μολονότι ο αριθμός (σύνολο 31 οικογένειες) των ασθενών που αναλύθηκαν για τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις είναι σχετικά μικρός, οι μεταλλάξεις αυτές δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα συχνές.

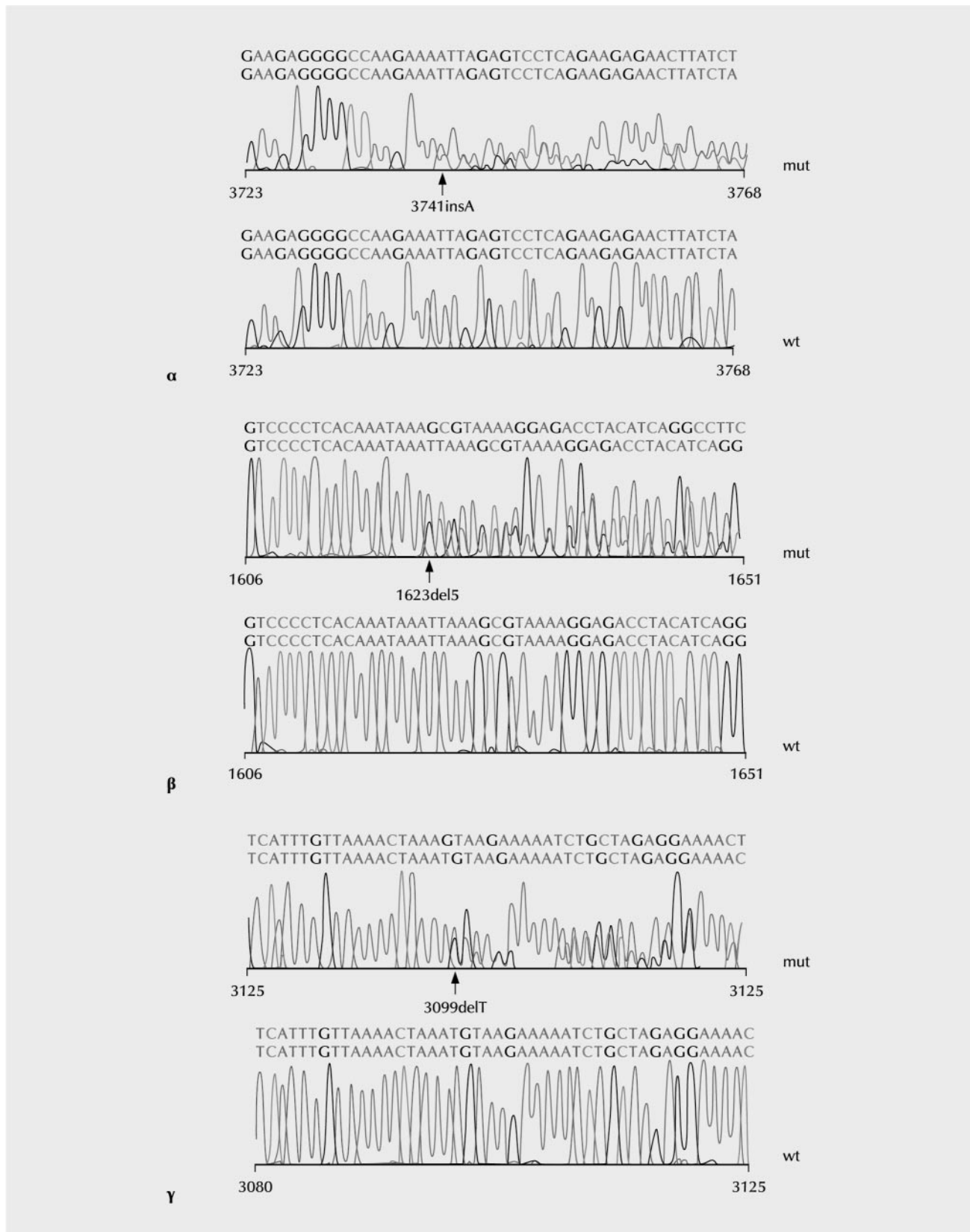
Επίσης, αναλύθηκαν τα εξόνια 2, 5 και 20, στα οποία έχουν ανιχνευθεί οι ιδρυτικές μεταλλάξεις 185delAG, C61G και 5382insC. Οι μεταλλάξεις αυτές παρουσιάζουν αρκετά υψηλή συχνότητα³⁹ σε χώρες της Κεντρικής, Ανατολικής και Νότιας Ευρώπης, όπως η Ουγγαρία,¹⁶ η Πολωνία,⁴⁰ η Γιουγκοσλαβία,³³ η Λετονία,³⁷ η Ρωσία,¹⁷ η Ιταλία²³ και η Ισπανία.²⁹ Ειδικά η μετάλλαξη 5382insC είναι η πιο κοινή μετάλλαξη σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ενώ υπάρχει ιδιαίτερα υψηλή συχνότητά της σε οικογένειες Ουγγρικής καταγωγής με καρκίνο του μαστού και οικογένειες Ρωσικής καταγωγής με καρκίνο των ωοθηκών. Καμία από τις τρεις αυτές ιδρυτικές μεταλλάξεις δεν βρέθηκε στο γενομικό DNA των ασθενών Ελληνικής καταγωγής. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το φάσμα των μεταλλάξεων, τουλάχιστον όσον αφορά τις τρεις αυτές μεταλλάξεις, στον Ελληνικό πληθυσμό πρέπει να είναι αρκετά διαφορετικό από εκείνο που έχει αναφερθεί σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες.

Πολυμορφισμοί

Ταυτοποιήθηκαν τρεις γνωστοί πολυμορφισμοί, οι A3232G (Glu1038Gly), C2731T (Pro871Leu) στο εξόνιο 11 και A4956G (Ser1613Gly) στο εξόνιο 16. Όσον αφορά τη μετάλλαξη E1038G, αναλύθηκαν 44 ασθενείς και βρέθηκαν 24 ετεροζυγώτες (55%), 5 ομοζυγώτες (11%) και 15 (34%) που φέρουν και τα δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα. Σε υγιή άτομα, οι αντίστοιχες τιμές ήταν 16 (39%), 4 (10%) και 21 (51%). Όσον αφορά τα δείγματα των ασθενών, η συχνότητα του φυσιολογικού αλληλόμορφου προς το μεταλλαγμένο υπολογίστηκε σε 0,61/0,39. Οι αντίστοιχες τιμές για τα δείγματα υγιών ατόμων είναι 0,71/0,29. Θα πρέπει να τονισθεί ότι οι τρεις παραπάνω μεταλλάξεις βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ουσιαστικά σε πολύ συγκρίσιμες συχνότητες. Οι ανωτέρω τιμές συμφωνούν με τις συχνότητες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία σε διάφορες χώρες.^{38,41–43} Μολονότι οι πολυμορφισμοί αυτοί από μόνοι τους δεν συσχετίζονται άμεσα με τη νόσο, έχει προταθεί από τους Janezic et al⁴³ ότι μπορεί να συμβάλλουν στην εκδήλωση της νόσου σε συνδυασμό με άλλες παθογόνες μεταλλάξεις.

Μεταλλάξεις εσονίων

Μια επιπλέον μετάλλαξη, η οποία ανιχνεύθηκε στο εσόνιο 18 (IVS18+65 G>A), έχει ήδη καταγραφεί στη



Εικόνα 2. Αυτόματη ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA, που δείχνει τις αλλαγές στο πλαίσιο ανάγνωσης που προκαλούνται από τις μεταλλάξεις, σε σύγκριση με τη φυσιολογική αλληλουχία. (α) 3741insA, (β) 1623del5-TTAAA, (γ) 3099delT.

βάση δεδομένων BIC. Δύο ασθενείς έφεραν μεταλλάξεις στο εσόνιο 16 (IVS16-68, IVS16-92). Οι μεταλλάξεις αυτές των εσονίων είναι δύσκολο να κατηγοριοποιηθούν, δεδομένου ότι το δυνητικό αποτέλεσμά τους στη λειτουργία του γονιδίου μπορεί να είναι είτε σημαντικό είτε απολύτως ασήμαντο. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να γίνουν επιπλέον λειτουργικές μελέτες για την έκφραση του mRNA των συγκεκριμένων ασθενών, δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις εσονίων έχουν συχνά ως αποτέλεσμα διαφορετικού τύπου μάτισμα (splicing) του mRNA, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ανενεργού πρωτεΐνης. Δεδομένου ότι οι δύο αυτές μεταλλαγές του εσονίου 16 δεν έχουν εντοπιστεί σε άλλους πληθυσμούς μέχρι σήμερα, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νέων απλοτύπων του γονιδίου *BRCA1*, ειδικών για τον Ελληνικό πληθυσμό.

Συμπερασματικά, σε αυτή την πιλοτική μελέτη σε Ελληνικές οικογένειες με ιστορικό καρκίνου μαστού/ωοθηκών ταυτοποιήθηκαν 3 παθογόνες μεταλλάξεις στο εσόνιο 11 του γονιδίου *BRCA1*. Είναι οι πρώτες μεταλλάξεις που εντοπίζονται στον Ελληνικό πληθυσμό. Παρότι ο αριθμός των οικογενειών που μελετήθηκαν είναι μικρός, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου *BRCA1* στον Ελληνικό πληθυσμό είναι σχετικά υψηλή, ακόμα και σε οικογένειες μέτριου κινδύνου. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι οικογένειες που συμπεριλαμβάνονταν στη μελέτη ήταν

μέτριου (2 μέλη) και υψηλού (3 μέλη και άνω) κινδύνου. Ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού οικογενειών είναι σε εξέλιξη, για να καθοριστεί το φάσμα των μεταλλάξεων του γονιδίου *BRCA1* στην Ελλάδα. Επίσης, βρίσκεται σε εξέλιξη ανίχνευση μεταλλάξεων του *BRCA2* στις οικογένειες εκείνες όπου δεν παρατηρήθηκε καμία μετάλλαξη στο *BRCA1*.

Όσον αφορά τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, ο συνδυασμός της τεχνικής του πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης με απευθείας αυτόματη ανάλυση της αλληλουχίας του γενομικού DNA μπορεί, σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα και με μέτριο κόστος, να δώσει πολύ έγκυρα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη διαγνωστικής μεθόδου για την ανάλυση της προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών σε οικογένειες με βεβαρημένο ιστορικό για το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Η ανάπτυξη των εξετάσεων αυτών σε κλινικό επίπεδο θα πρέπει να συνδυαστεί με την παράλληλη καθιέρωση του θεσμού του γενετικού συμβούλου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς αισθάνονται την ανάγκη να ευχαριστήσουν τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη.

ABSTRACT

Development of a diagnostic method for the detection of *BRCA1* mutations in breast/ovarian cancer families from Greece

I. KONSTANTOPOULOU,¹ Ch. KROUPIS,² A. LADOPOULOU,¹ A. PANTAZIDIS,¹

D. BOUMBA,¹ E.S. LIANIDOU,² M. PETERSEN,³ L. FLORENTIN,⁴ G. FOUNTZILAS,^{5,6} D. YANNOUKAKOS¹

¹Molecular Diagnostics Lab, I/R-RP, National Center for Scientific Research "Demokritos", Athens

²Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens

³Department of Genetics, Institute of Child Health, Athens

⁴Molecular Biology and Cytogenetics Center "AlphaLab", Athens

⁵AHEPA Hospital, Aristotle University of Thessaloniki, Medical School

⁶Hellenic Cooperative Oncology Group, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(2):161-170

OBJECTIVE The aim of this study was to design a diagnostic procedure for the detection and identification of *BRCA1* gene mutation specific for Greek families at high risk for developing breast or ovarian cancer. **METHOD** A combination of polymerase chain reaction, protein truncation test (for exon 11) and direct DNA sequencing techniques was applied on genomic DNA isolated from patients belonging to families with a history of two or more cases of breast cancer before 50 years or ovarian cancer at any age. **RESULTS** Three frameshift-producing mutations were identified in exon 11, the 3741insA, the 1623del5-TTAAA and the 3099delT. The first mutation is reported only once in the BIC database, in a Turkish family living in Germany, the second is reported 6 times and the third is a novel mutation. The known polymorphisms from other populations, E1038G (exon 11),

P871L (exon 11) and S1613G (exon 16), were also detected in the Greek population. One novel unclassified double variant was also detected in exon 16 (IVS16-68 G>A, IVS16-92 G>A) as well as another known unclassified intronic variant in intron 18 (IVS18+65 G>A). **CONCLUSIONS** In this pilot study it was shown that (a) frameshift mutations of *BRCA1* gene are identified in the Greek population, (b) known polymorphisms are found also in the Greek population, (c) this procedure can be used for diagnostic purposes in families with a history of breast and/or ovarian cancer.

Key words: *BRCA1*, Breast/ovarian cancer, Greece

Βιβλιογραφία

- MIKI W, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S ET AL. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994, 226:66–71
- FUTREAL PA, LIU Q, SHATTUCK-EIDENS D, COCHRAN C, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S ET AL. *BRCA1* mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994, 266:120–122
- WOOSTER R, BIGNELL G, LANCASTER J, SWIFT S, SEAL S, MANGION J ET AL. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 1995, 378:789–792
- CLAUS EB, SCHILDKRAUT JM, THOMPSON WD, RISCH NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996, 77:2318–2324
- SZABO CI, KING MC. Population genetics of *BRCA1* and *BRCA2*. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1013–1020
- NEUHAUSEN SL. Ethnic differences in cancer risk resulting from genetic variation. *Cancer* 1999, 86:2575–2582
- FRANK TS, MANLEY SA, OLOPADE OI, CUMMINGS S, GARBER JE, BERNHARDT B ET AL. Sequence analysis of *BRCA1* and *BRCA2*: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol* 1998, 16:2417–2425
- FITZGERALD MG, MACDONALD DJ, KRAINER M, HOOVER I, O'NEIL E, UNSAL H ET AL. Germ-line *BRCA1* mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *N Engl J Med* 1996, 334:143–149
- LANGSTON AA, MALONE KE, THOMPSON JD, DALING JR, OSTRANDER EA. *BRCA1* mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med* 1996, 334:137–142
- MALONE KE, DALING JR, THOMPSON JD, O'BRIEN CA, FRANCISCO LV, OSTRANDER EA. *BRCA1* mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *JAMA* 1998, 279:922–929
- NEWMAN B, MU H, BUTLER LM, MILLIKAN RC, MOORMAN PG, KING MC. Frequency of breast cancer attributable to *BRCA1* in a population-based series of American women. *JAMA* 1998, 279:915–921
- LARSON JS, TONKINSON JL, LAI MT. A *BRCA1* mutant alters G2-M cell cycle control in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1997, 57:3351–3355
- CORTEZ D, WANG Y, QIN J, ELLEDGE SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of *BRCA1* in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999, 286:1162–1166
- SCULLY R, CHEN J, PLUG A, XIAO Y, WEAVER D, FEUNTEUN J ET AL. Association of *BRCA1* with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997, 88:265–275
- RAMUS SJ, FRIEDMAN LS, GAUTHER SA, PONDER BA, BOBROW L, VAN DER LOOIJ M ET AL. A breast/ovarian cancer patient with germline mutations in both *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet* 1997, 15:14–15
- RAMUS SJ, KOTE-JARAI Z, FRIEDMAN LS, VAN DER LOOIJ M, GAUTHER SA, CSOKAY B ET AL. Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Hungarian families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1242–1246
- GAYTHER SA, HARRINGTON P, RUSSELL P, KHARKEVICH G, GARKAVTSEVA RF, PONDER BA. Frequently occurring germ-line mutations of the *BRCA1* gene in ovarian cancer families from Russia. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1239–1242
- DE BENEDETTI VM, RADICE P, PASINI B, STAGI L, PENSOTTI V, MONDINI P ET AL. Characterization of ten novel and 13 recurring *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations in Italian breast and/or ovarian carcinoma patients. Mutations in brief No 178. Online. *Hum Mutat* 1998, 12:1–5
- SANTAROSA M, DOLCETTI R, MAGRI MD, CRIVELLARI D, TIBILETTI MG, GALLO A ET AL. *BRCA1* and *BRCA2* genes: role in hereditary breast and ovarian cancer in Italy. *Int J Cancer* 1999, 83:5–9
- MONTAGNA M, SANTACATTERINA M, TORRI A, MENIN C, ZULLATO D, CHIECO-BIANCHI L ET AL. Identification of a 3 kb Alu-mediated *BRCA1* gene rearrangement in two breast/ovarian cancer families. *Oncogene* 1999, 18:4160–4165
- SANTAROSA M, VIEL A, DOLCETTI R, CRIVELLARI D, MAGRI MD, PIZZICHETTA MA ET AL. Low incidence of *BRCA1* mutations among Italian families with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 1998, 78:581–586
- MONTAGNA M, SANTACATTERINA M, CORNEO B, MENIN C, SEROVA O, LENOIR GM ET AL. Identification of seven new *BRCA1* germline mutations in Italian breast and breast/ovarian cancer families. *Cancer Res* 1996, 56:5466–5469
- CALIGO MA, GHIMENTI C, CIPOLLINI G, RICCI S, BRUNETTI I, MARCHETTI V ET AL. *BRCA1* germline mutational spectrum in Italian families from Tuscany: a high frequency of novel mutations. *Oncogene* 1996, 13:1483–1488
- LAPLACE-MARIEZE V, PRESNEAU N, SYLVAIN V, KWIAKOWSKI F, LORTHOLARY A, HARDOUIN A ET AL. Systematic sequencing of the *BRCA-1* coding region for germ-line mutation detection in 70 French high-risk families. *Int J Oncol* 1999, 14:971–977
- STOPPA-LYONNET D, LAURENT-PUIG P, ESSILOUX L, PAGES S, ITHIER G, LIGOT L ET AL. *BRCA1* sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. Institut Curie Breast Group. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1021–1030

26. EISINGER F, ALBY N, BREMOND A, DAUPLAT J, ESPIE M, JANIAUD P ET AL. Recommendations for medical management of hereditary breast and ovarian cancer: the French National Ad Hoc Committee. *Ann Oncol* 1998, 9:939–950
27. DIEZ O, CORTES J, DOMENECH M, BRUNET J, DEL RIO E, PERICAY C ET AL. *BRCA1* mutation analysis in 83 Spanish breast and breast/ovarian cancer families. *Int J Cancer* 1999, 83:465–469
28. DIEZ O, OSORIO A, ROBLEDO M, BARROSO A, CORTES J, DOMENECH M ET AL. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* Jewish mutations in Spanish breast cancer patients. *Br J Cancer* 1999, 79:1302–1303
29. DIEZ O, DOMENECH M, ALONSO MC, BRUNET J, SANZ J, CORTES J ET AL. Identification of the 185delAG *BRCA1* mutation in a Spanish Gypsy population. *Hum Genet* 1998, 103:707–708
30. OSORIO A, ROBLEDO M, SAN ROMAN JM, ALBERTOS J, ANDRADE J, BARABASH A ET AL. Mutation analysis of the *BRCA2* gene in breast/ovarian cancer Spanish families: identification of two new mutations. *Cancer Lett* 1997, 121:115–118
31. OSORIO A, ROBLEDO M, ALBERTOS J, DIEZ O, ALONSO C, BAIGET M ET AL. Molecular analysis of the six most recurrent mutations in the *BRCA1* gene in 87 Spanish breast/ovarian cancer families. *Cancer Lett* 1998, 123:153–158
32. BLESA JR, GARCIA JA, OCHOA E. Frequency of germ-line *BRCA1* mutations among Spanish families from a Mediterranean area. Mutation in brief No 305. Online. *Hum Mutat* 2000 15:381–382
33. PAPP J, RAICEVIC L, MILASIN J, DIMITRIJEVIC B, RADULOVIC S, OLAH E. Germline mutation analysis of *BRCA1* and *BRCA2* genes in Yugoslav breast/ovarian cancer families. *Oncol Rep* 1999, 6:1435–1438
34. BALCI A, HUUSKO P, PAAKKONEN K, LAUNONEN V, UNER A, EKMECKI A ET AL. Mutation analysis of *BRCA1* and *BRCA2* in Turkish cancer families: a novel mutation *BRCA2* 3414del4 found in male breast cancer. *Eur J Cancer* 1999, 35:707–710
35. HOGERVORST FB, CORNELIS RS, BOUT M, VAN VLIET M, OOSTERWIJK JC, OLMER R ET AL. Rapid detection of *BRCA1* mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 1995, 10:208–212
36. SCHOFIELD AC, HAITES NE. Novel 5 bp germline deletion in exon 11 of the *BRCA1* gene. *Hum Mutat* 1998, (Suppl 1):S187–S188
37. CSOKAY B, TIHOMIROVA L, STENGREVIC S, SINICKA O, OLAH E. Strong founder effects in *BRCA1* mutation carrier breast cancer patients from Latvia. Mutation in brief No 258. Online. *Hum Mutat* 1999, 14:92
38. INOUE R, FUKUTOMI T, USHISIMA T, MATSUMOTO Y, SUGIMURA T, NAGAO M. Germline mutation of *BRCA1* in Japanese breast cancer families. *Cancer Res* 1995, 55:3521–3524
39. OLAH E. Molecular cancer genetics in eastern and central Europe. *Dis Markers* 1999, 15:75–77
40. SOBCZAK K, KOZLOWSKI P, NAPIERALA M, CZARNY J, WOZNIAK M, KAPUSCINSKA M ET AL. Novel *BRCA1* mutations and more frequent intron-20 alteration found among 236 women from Western Poland. *Oncogene* 1997, 15:1773–1779
41. DUNNING AM, CHIANO M, SMITH NR, DEARDEN J, GORE M, OAKES S ET AL. Common *BRCA1* variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet* 1997, 6:285–289
42. DUROCHER F, SHATTUCK-EIDENS D, McCLURE M, LABRIE F, SKOLNICK MH, GOLDFAR DE ET AL. Comparison of *BRCA1* polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet* 1996, 5:835–842
43. JANEZIC SA, ZIOGAS A, KRUMROY LM, KRASNER M, PLUMMER SJ, COHEN P ET AL. Germline *BRCA1* alterations in a population-based series of ovarian cancer cases. *Hum Mol Genet* 1999, 8:889–897

Corresponding author:

D. Yannoukakis, Molecular Diagnostics Lab, I/R-RP, National Center for Scientific Research “Demokritos”, GR-153 10 Agia Paraskevi, Athens, Greece