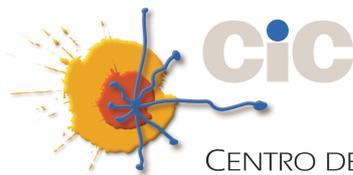


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA. UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR**



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

***“ NUEVAS APORTACIONES A LA CARACTERIZACIÓN
DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD EN CÁNCER DE MAMA ”***

Marta Rubio Rodrigo
Diciembre de 2008

D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Nuevas aportaciones a la caracterización de genes de susceptibilidad den cáncer de mama” que presenta la licenciada en Biología D^a Marta rubio Rodrigo, ha sido realizado bajo su dirección en la unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente a fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 3 de Noviembre de 2008.

Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Dr. D. Juan Jesús Cruz Hernández

Este proyecto ha sido financiado por el Programa de Consejo Genético en Cáncer Hereditario de la Junta de Castilla y León.

Durante el transcurso de este trabajo, Marta Rubio Rodrigo ha sido beneficiaria de una beca de formación de personal investigador de la Junta de Castilla y León (orden BOCYL 29 de octubre de 2002, resolución BOCYL 23/06/2003).

- ÍNDICE GENERAL -

INTRODUCCIÓN	4
1.- INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA	5
2.- EL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO	10
3.- ESTRUCTURA DE BRCA1 Y BRCA2	11
3.1.- ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA BRCA1	11
3.2.- ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA BRCA2	12
4.- FUNCIONES DE BRCA1 Y BRCA2	13
4.1.- FUNCIONES DE BRCA1	13
4.1.1.- ACTIVIDAD UBIQUITINA-LIGASA	13
4.1.2.- REGULADOR TRANSCRIPCIONAL	18
4.1.3.- REGULADOR DEL CICLO CELULAR	20
4.1.4.- REPARACIÓN DE ADN	21
A) Reparación por escisión de nucleótidos (NER)	22
B) Reparación de roturas de doble cadena o “DSBs”	23
- Unión de extremos no homólogos (NHEJ)	24
- Recombinación homóloga (HR)	25
4.2.- FUNCIONES DE BRCA2	27
4.2.1.- REGULADOR TRANSCRIPCIONAL	27
4.2.2.- REPARACIÓN DE ADN	29
A) BRCA2 y la recombinación homóloga	29
B) BRCA2 y la ruta de la Anemia de Fanconi (FA)	32
4.2.3.- BRCA2 Y REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	34
5.- OTROS GENES DE PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER DE MAMA	34
5.1.- GENES DE ALTA PENETRANCIA	35
5.1.1.- p53	35
5.1.2.- PTEN	35
5.1.3.- LKB1/STK11	36
5.1.4.- CDH1/E-cadherina	36
5.2.- GENES DE BAJA PENETRANCIA	37
5.2.1.- ATM	37
5.2.2.- TGFβ1	38
5.2.3.- CASP8	38
5.2.4.- CHEK2	38
5.3.- EXISTE BRCAx?	39
6.- ESPECTRO MUTACIONAL DE BRCA1 Y BRCA2	40
6.1.- TIPOS DE MUTACIONES SEGÚN SU EFECTO FISIOPATOLÓGICO	41
6.1.1.- MUTACIONES PATOGENICAS	41

6.1.2.- MUTACIONES NEUTRALES O POLIMORFISMOS	43
6.1.3.- MUTACIONES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO	44
7.- IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO	46
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	49
<hr/>	
MATERIAL Y MÉTODOS	52
<hr/>	
1.- PACIENTES EN ESTUDIO	53
2.- CONTROLES	55
3.- EXTRACCIÓN DE DNA	55
4.- AMPLIFICACIÓN DEL DNA	56
5.- PCR “EXTENDED”	63
6.- EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR	64
7.- ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS MEDIANTE CSGE	69
8.- DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE dHPLC	70
9.- DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	71
10.- SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA	74
11.- ANÁLISIS DE GRANDES ALTERACIONES GENÓMICAS MEDIANTE MLPA.	74
12.- PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS	79
RESULTADOS	85
<hr/>	
1.- MUTACIONES PUNTUALES ENCONTRADAS EN BRCA1 Y BRCA2	86
1.1.- MUTACIONES PATOGÉNICAS	86
1.1.1.- MUTACIONES PATOGÉNICAS EN BRCA1	86
A) Cambios en el marco de lectura	87
B) Mutaciones sin sentido “nonsense”	88
C) Cambios de aminoácido patogénicos	89
D) Mutaciones que afectan a la maduración del mRNA	91
1.1.2.- MUTACIONES PATOGÉNICAS EN BRCA2	94
A) Cambios en el marco de lectura	94
B) Mutaciones sin sentido “nonsense”	97
1.2.- POLIMORFISMOS NEUTRALES	98
1.2.1.- POLIMORFISMOS DE BRCA1	99
1.2.2.- POLIMORFISMOS DE BRCA2	103
1.3.- VARIANTES SIN CLASIFICAR (“UVs”)	108
1.3.1.- VARIANTES SIN CLASIFICAR DE BRCA1	108
1.3.2.- VARIANTES SIN CLASIFICAR DE BRCA2	110
2.- ESTUDIO PORMENORIZADO DE ALGUNAS VARIANTES SIN CLASIFICAR	112
2.1.- RASTREO DE LAS VARIANTES EN LA POBLACIÓN GENERAL	112

2.2.- SITUACIÓN DENTRO DE LA PROTEÍNA Y TIPO DE CAMBIO DE AMINOÁCIDO	116
2.3.- CONSERVACIÓN ENTRE ESPECIES	117
2.4.- ESTUDIOS “IN SILICO”	118
2.5.- ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO DE mRNA	119
2.6.- PRESENCIA SIMULTÁNEA DE MUTACIONES PATOGENICAS CON LAS VARIANTES “UV”	124
2.7.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	124
3.- ESTUDIO DE GRANDES REORDENAMIENTOS EN BRCA1 Y BRCA2	127
DISCUSIÓN	130
<hr/>	
1.- RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES PUNTUALES EN BRCA1 Y BRCA2	131
1.1.- MUTACIONES PATOGENICAS	132
1.1.1.- MUTACIONES PATOGENICAS DE BRCA1	135
1.1.2.- MUTACIONES PATOGENICAS DE BRCA2	139
1.2.- POLIMORFISMOS NEUTRALES	143
1.2.1.- POLIMORFISMOS DE BRCA1	143
1.2.2.- POLIMORFISMOS DE BRCA2	148
1.3.- VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO	153
1.3.1.- VARIANTES “UV” ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE PACIENTES	153
1.3.2.- ANÁLISIS PORMENORIZADO DE ALGUNAS VARIANTES “UV” DEL GEN BRCA2	156
A) Variantes que pueden considerarse neutrales	156
B) Variantes con posible efecto patogénico	159
2.- GRANDES REESTRUCTURACIONES EN BRCA1 Y BRCA2	163
CONCLUSIONES	166
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	168
<hr/>	

INTRODUCCIÓN

1.- INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA:

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la población femenina. En la unión Europea se estima que la posibilidad de desarrollar un cáncer de mama antes de los 75 años es de un 8%. En España, la incidencia de cáncer de mama es una de las más bajas de Europa, oscila según comunidades entre 40 y 75 casos nuevos por cada 100.000 mujeres (Pollán et al., 2007). Se calcula que cada año se diagnostican en España unos 16.000 nuevos casos de cáncer de mama y que, por esta causa, fallecen unas 6.000 mujeres al año. En Castilla y León la tasa de incidencia estimada es de 60 casos por cada 100.000 mujeres y la tasa de mortalidad es de 32,8 fallecimientos por cada 100.000 mujeres, según los datos disponibles en el registro de Tumores de Mama y Cervix de la comunidad. Por otro lado, en la última década hemos asistido a un aumento de la supervivencia, con un 78% de supervivencia a los cinco años del diagnóstico (“Avances en cáncer de mama”, 2005).

La etiología del cáncer de mama es desconocida, y sólo un 30% de los tumores de mama pueden ser atribuidos a factores de riesgo conocidos. Los más comunes se describen a continuación.

La incidencia es muy baja en menores de 25 años y aumenta hasta 100 veces a partir de los 45 (Hulka B. et al. 2001). Además, la incidencia de la enfermedad en mujeres es mucho más alta que en varones (Hill et al., 2005), lo que sugiere que hay implicación de la edad y de las hormonas sexuales en la etiología (Pike 1993), dado que ellas son las que determinan el desarrollo y diferenciación de las mamas.

De acuerdo con esto, se ha relacionado una mayor exposición a hormonas sexuales endógenas a lo largo de la vida con un aumento en el riesgo: una menarquia temprana (antes de los 12 años) está asociada con un incremento del 10-20% en el riesgo de desarrollar la enfermedad (Berkey et al. 1999; Kelsey et al. 1993; Titus-Ernstoff et al. 1998; Brinton et al. 1988). Este efecto se debe probablemente a la exposición prolongada del epitelio mamario a los estrógenos y la progesterona durante un mayor número de ciclos ovulatorios o a los niveles altos de estradiol durante la adolescencia de estas mujeres (Bernstein 2002). De igual forma, una edad tardía de menopausia (después de los 54 años) maximiza el número de ciclos

ovulatorios y conduce a un aumento del riesgo. Por el contrario, las mujeres con menopausia inducida quirúrgicamente (por ovariectomía o histerectomía) antes de los 35 años presentan un descenso en el riesgo (McPherson K. et al. 2000). Asimismo, una edad temprana para el primer embarazo y un mayor número de gestaciones proporcionan un efecto protector. De forma opuesta, las mujeres nulíparas o de más de 35 años en su primer embarazo presentan un aumento en el riesgo (Pathak D. R., et al. 2000), probablemente por una menor sensibilidad a los carcinógenos en la mama diferenciada que tiene una tasa de proliferación menor (Sivaraman L. et al, 2002). Por último, la lactancia prolongada también ha demostrado tener un efecto protector (Lipworth L. et al. 2000; Beral V. 2002), quizás debido al menor número de ciclos ovulatorios y, consecuentemente, a la menor exposición a hormonas (Bernstein L. 2002).

Además de los metabolitos endógenos, se ha estudiado ampliamente la correlación entre la exposición a hormonas exógenas y el aumento del riesgo. En este sentido, la terapia hormonal sustitutiva (HRT) administrada frente a las molestias de la menopausia, ha sido el objeto de múltiples trabajos. Un metaanálisis del “Collaborative group on hormonal factors in breast cancer” (1997) estimaba el aumento del riesgo de cáncer de mama en un 2,3% por año de uso de HRT. Al cesar el tratamiento, el riesgo se normalizaba en los siguientes 5 a 10 años. Otros trabajos posteriores obtuvieron resultados similares (Beral V. et al., 2005; Gertig D. M. et al., 2006; Chen W. Y. Et al., 2006).

El estudio WHI (2004) incluyó a 16608 mujeres sanas, a las que se les administró terapia combinada estrógenos/progesterona o un placebo. Este estudio se finalizó antes de la fecha prevista a causa del aumento en el riesgo de infarto, trombosis venosa y cáncer de mama en las participantes. En las mujeres que tomaron únicamente estrógenos el riesgo de cáncer era muy leve, pero el de infarto aumentó (Anderson et al., 2004).

El estudio WISDOM (2002), que incluyó 22000 mujeres, también tuvo que terminar bruscamente debido al aumento del riesgo de cáncer de mama en el grupo que tomaba HRT.

El estudio NHS (2006) incluye 121700 mujeres y lleva en curso 30 años. En este no parece haber aumento del riesgo, salvo a partir de los 20 años de uso.

El aumento de cáncer de mama en estos estudios podría deberse no a cánceres directamente provocados por la HRT, sino a tumores preexistentes que crecen más rápido

gracias a la influencia de las hormonas administradas. Sin embargo, en el estudio NHS, podrían ser tumores de novo, ya que el riesgo sólo aumenta a partir de los 20 años.

Ante la evidencia de un mayor riesgo debido al HRT, se ha establecido un consenso según el cual es apropiado este tratamiento en aquellas mujeres con síntomas muy fuertes de menopausia y que tienen un riesgo normal de enfermedad cardiovascular e infarto (Ettinger et al., 2006); además, se recomienda el intervalo de uso de HRT más corto y a la dosis mínima posible (North American Menopause Society, 2004; Hormone Therapy, 2004).

El segundo foco de atención sobre hormonas exógenas corresponde a los anticonceptivos orales. El aumento de riesgo de cáncer de mama debido a su uso ha sido investigado por numerosos grupos, con resultados negativos en su mayor parte: Gill et al. concluyen que no existe asociación entre la aparición de carcinoma de mama in situ y la toma de anticonceptivos orales, incluso tras 40 años de uso de los mismos (Gill et al., 2006). En el trabajo de Folger et al. se analizó el posible aumento del riesgo en mujeres que tomaron anticonceptivos durante menos de seis meses, y no observaron diferencias significativas respecto a los controles que nunca han tomado la medicación (Folger et al., 2007). En otros estudios se han observado resultados similares (Wingo et al. 1995; Olsson et al., 1989; Romieu et al. 1990; McPherson et al. 1983; Brinton et al., 1995; Marchbanks et al., 2002). En los trabajos en que se observaba un aumento del riesgo, este podría ser debido al reducido número de muestras que podrían estar introduciendo un sesgo, u ocultar otros factores de riesgo (La Vecchia et al. 1995; Lipworth et al. 1995, Chie et al. 1998).

El segundo grupo de factores de riesgo está relacionado con el estilo de vida.

Se ha observado un predominio de cáncer de mama en los países industrializados, siendo zonas de “alto riesgo” Norteamérica y el norte de Europa. Las variaciones en la incidencia entre áreas geográficas distintas podrían atribuirse a diferencias genéticas entre las poblaciones o al estilo de vida. La incidencia de cáncer aumenta al trasladarse de una zona de bajo riesgo a una de alto, remarcando la importancia de los factores socioculturales y ambientales (Parkin 2004, Parkin et al. 1999, Ziegler et al., 1993).

Numerosos estudios epidemiológicos han encontrado asociación entre la ingesta de alcohol y el riesgo de cáncer en mujeres pre- y postmenopáusicas (Singletary et al., 2001;

Kelsey et al., 1996). Según Smith-Warner et al., por cada incremento de 10g diarios en la toma de alcohol, el riesgo aumenta un 9% . Por otro lado, las mujeres posmenopáusicas con alta ingesta de alcohol y baja de folato en la dieta, tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores ER- (Sellers et al., 2002). En contraposición, el aumento de folato en la dieta podría prevenir el desarrollo de cáncer de mama en aquellas mujeres que consumen alcohol (Zhang, 2004).

La obesidad es otro factor de riesgo moderado para el cáncer de mama (riesgo relativo 1,1-2,5). Las mujeres obesas tiene un mayor riesgo de cáncer de mama posmenopáusico (Lahmann et al., 2004; Van der Brandt et al. 2000). En un estudio con 495477 mujeres estadounidenses a lo largo de 16 años, se observó que en el grupo de las mujeres obesas la tasa de muertes por cáncer de mama era el doble que en el grupo de menor índice de masa corporal (Calle et al., 2003). Además, las pacientes obesas con cáncer de mama parecían tener un riesgo más alto de desarrollar metástasis en los nódulos linfáticos, tenían tumores más grandes y mayor tasa de muertes que las pacientes no obesas (Berclaz et al., 2004; Calle et al., 2003).

Existen varias hipótesis que tratan de explicar este aumento del riesgo debido a la obesidad: En las personas obesas hay una proporción de tejido graso de hasta el 60-70% frente a un 9-18%, que son los valores normales. Las mujeres obesas tienen una mayor producción de estrógenos, ya que en el tejido adiposo tiene lugar la conversión de andrógenos a estrógenos mediante la enzima aromatasa y una mayor exposición a estrógenos de las células epiteliales mamarias aumenta el riesgo de cáncer de mama (Rose et al., 2004). Por otro lado, existe un aumento de insulina e IGF circulantes en individuos obesos. Estas sustancias promueven la mitosis, inhiben la apoptosis y pueden inducir angiogénesis. Además, sus rutas interactúan con la vía del receptor de estrógenos aumentando el riesgo de cáncer. Todo ello en conjunto provoca un aumento en el riesgo a padecer cáncer de mama (Del Giudice et al., 1998; Sachdev et al., 2004; Khandwala et al., 2000; Kaaks et al., 1996).

En relación con la dieta, a pesar de la cantidad ingente de material publicado hasta la fecha, no existe una asociación consistente ni estadísticamente significativa para ninguno de los nutrientes estudiados. En muchos de estos trabajos se relaciona un aumento en la ingesta de grasas con mayor riesgo; sin embargo, la significación es muy ajustada, como en el meta-

análisis de estudios caso-control de Boyd et al. (Boyd et al., 2003). Otros estudios presentan resultados similares, o no significativos, o los cambios no se mantienen en el tiempo (Dorgan et al., 2003; Woods et al., 1996; Gann et al., 2003; Cho et al., 2003; Prentice et al., 2006).

Algunos estudios en animales registran una menor tasa de tumores mamarios en roedores con dietas bajas en grasa (Carroll et al., 1968; Freedman et al., 1990). Asimismo, se ha relacionado una dieta rica en fibra con una disminución del riesgo (Key et al., 2003; Dos Santos Silva et al., 2002). Este efecto podría tener su origen en el tracto digestivo, donde las grasas promueven la reabsorción intestinal de los estrógenos, aumentando los niveles de hormonas circulantes, mientras que la fibra retarda este proceso.

No obstante, la influencia de la dieta en el aumento o disminución de riesgo de cáncer depende en gran medida del origen étnico del sujeto, su historia reproductiva, el país donde vive y otros factores relacionados con el estilo de vida, siendo muy difícil desligar unos elementos de otros para asignarles su parte de contribución al riesgo total (Haiman et al., 2002; Pinheiro et al., 2005).

La densidad mamográfica se sitúa como un factor de riesgo bien establecido, tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas (Brinton et al., 1995; Boyd et al., 1995). Según diversos estudios, las mujeres con mamas más densas presentan un mayor riesgo de cáncer de mama. Esto podría explicarse por la mayor proliferación celular y con ello un mayor riesgo de mutaciones en el epitelio mamario. (Boyd et al., 2007; Vachon et al., 2007; Martin et al., 2008).

Por último, tener una historia familiar de cáncer de mama aumenta el riesgo de padecerlo. Cuando hay un familiar de primer grado afectado por la enfermedad, el riesgo relativo es dos veces mayor que el de la población general. En los países occidentales, el riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida para una mujer es del 7,8%, mientras que para aquellas con un familiar de primer grado afecto es del 13,3% y con dos familiares aumenta hasta el 21,1% (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

2.- EL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

Uno de los objetivos principales en la lucha contra el cáncer es la identificación de los genes implicados en el desarrollo tumoral. Las proteínas codificadas por estos genes normalmente regulan procesos tales como proliferación, diferenciación y muerte celular. También se relacionan con tumorigénesis las que intervienen en reparación del DNA.

En general, está comúnmente aceptado que existen dos clases de genes de susceptibilidad: por un lado, genes con variantes alélicas que confieren un riesgo individual alto (genes de alta penetrancia) y, por otro, genes cuyas variantes confieren un riesgo bajo o moderado (genes de baja penetrancia).

La gran mayoría de los cánceres de mama son de tipo esporádico. Ciertas células de la mama acumulan aberraciones genéticas que desembocan en la aparición del tumor.

Los tumores esporádicos parece que surgen debido a errores combinados de múltiples genes de baja penetrancia junto con la influencia de los factores ambientales y otros factores de riesgo (Rebbeck 1999, Weber et al. 2000).

Aproximadamente un 5-10% de los cánceres de mama tienen una predisposición genética hereditaria: su origen se encuentra en mutaciones en la línea germinal de genes de susceptibilidad, de forma que el aumento del riesgo sobre la población general se transmite a las siguientes generaciones.

Los genes de predisposición suelen ser supresores de tumores: transmiten continuamente señales de carácter negativo sobre la proliferación celular y su inactivación provoca, por defecto, divisiones descontroladas (Hussain et al., 1998). Heredar una copia dañada del gen aumenta la predisposición al cáncer, pero es necesaria otra mutación para inactivarlo completamente y que se inicie la transformación neoplásica.

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mama pueden dividirse entre los que confieren “alto riesgo” y los que provocan “riesgo bajo a moderado”. Entre los primeros encontramos a BRCA1 y BRCA2, que son responsables de la mayoría de los casos hereditarios, y PTEN, TP53, LKB1/STK11 y CDH1. En el segundo grupo se incluyen CHEK2, TGFB1, CASP8 y ATM.

La expresión de BRCA1 y BRCA2 en condiciones normales está relacionada con el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales mamarias, especialmente durante la gestación y la lactancia. Aunque estos genes se expresan de forma ubicua, parece que su actividad repercute especialmente en las células de la mama.

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son responsables del 40-80% de todos los cánceres de mama hereditarios y no suelen aparecer en cáncer esporádico (Claus et al. 1991, Schubert et al. 1997, Easton et al. 1995).

Estos genes actúan como supresores de tumores (en su forma germinal evitan la transformación neoplásica), y siguen un modelo de herencia autosómico dominante de alta penetrancia. Los portadores de mutaciones en alguno de estos genes tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama y/o ovario a lo largo de su vida. Las mutaciones de BRCA1 y 2 dan lugar a la mayoría de los casos de cáncer de mama y ovario hereditarios. La detección de estas mutaciones permite la localización de individuos asintomáticos portadores que tienen un riesgo alto de desarrollar un cáncer a lo largo de su vida.

3.- ESTRUCTURA DE BRCA1 Y BRCA2

3.1.- ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA BRCA1

Este gen fue descubierto por Mary-Claire King y colaboradores en 1991 mediante análisis de ligamiento. Tres años más tarde, Mark Skolnick y colaboradores lo clonaron y caracterizaron (Hall et al. 1991, Miki et al. 1994).

El gen BRCA1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, más concretamente en la posición 17q21.31. Se extiende desde la base número 38.449.840 del cromosoma 17 hasta la 38.530.994 en la cadena menos, lo que suma 81.155 pares de bases. Consta de 24 exones, de los cuales el primero no es codificante.

Al transcribirse da lugar a una molécula de RNA mensajero de 7191 pares de bases. A partir de este transcrito primario se han descrito distintas isoformas de la proteína BRCA1 que surgen por maduración alternativa. La mayoritaria o forma completa (BRCA1a) tiene 1863 aminoácidos y un peso molecular de 207,72 kDa. A partir del transcrito primario surgen isoformas más cortas que han perdido uno o varios exones como BRCA1 Δ 2-10, BRCA1 Δ 9-

11, BRCA1 Δ 14-17, BRCA1 Δ 14-18, BRCA1 Δ 9-10, BRCA1 Δ 11, BRCA1 Δ 11b, BRCA1 Δ 9-10-11b. También existen isoformas completas que tienen un origen de transcripción distinto: BRCA1b y BRCA1a' (NCBI geneID 672, NM_007294 y NP_009225; GENECARD referencia GC17M038450).

BRCA1 consta de distintos dominios funcionales que le permiten interactuar con otras proteínas y con el DNA.

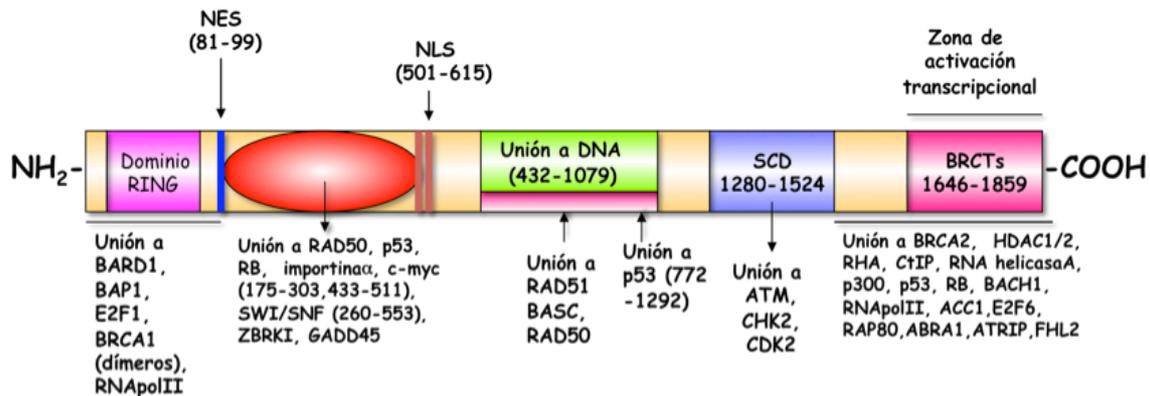


Figura 1: Esquema de los dominios estructurales de BRCA1 y proteínas que se unen a los mismos.

3.2.- ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA BRCA2

La búsqueda de un segundo gen que explicara la ausencia de mutaciones en BRCA1 en familias de alto riesgo y con casos de cáncer de mama en varones, permitió clonar y caracterizar el gen BRCA2 en 1995. Al principio no se observaron dominios funcionales obvios similares a los de otras proteínas. Pero, poco a poco, se han ido dilucidando su función e interacciones con otros factores (Stratton et al., 1994, Wooster et al., 1995).

El gen BRCA2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 13, en concreto en la posición 13q12.3. Se extiende desde la base 31.787.617 del cromosoma 13 hasta la 31.871.809 lo que suma 84193 pares de bases de región genómica.

Consta de 28 exones de los cuales el primero no es codificante. El transcrito de RNA mensajero tiene 11386 pares de bases, y al traducirse da lugar a una proteína de 3418 aminoácidos y 384,22 kDa de peso molecular. Hasta la fecha no existen datos sobre

isoformas de BRCA2 mas cortas surgidas de la maduración alternativa de su mRNA (NCBI GeneID:675, NM_000059, y NP_000050; GENECARD GC13P031787).

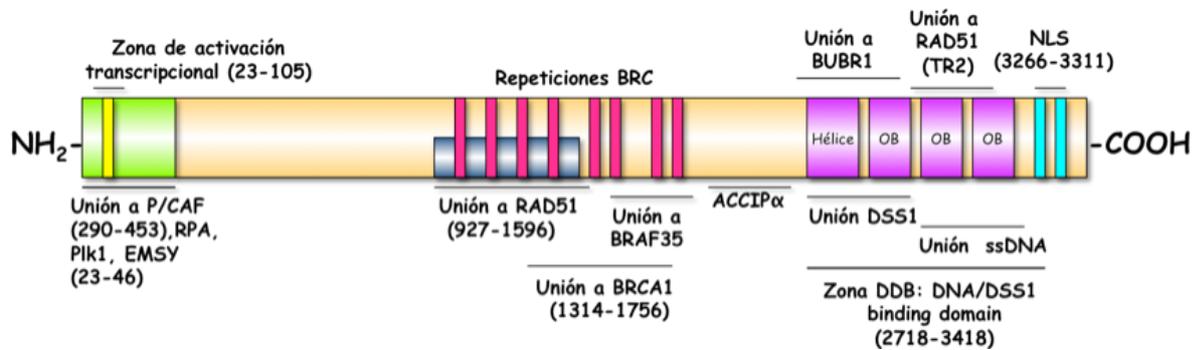


Figura 2: Esquema de los dominios funcionales de BRCA2 y proteínas que se unen a los mismos.

4.- FUNCIONES DE BRCA1 Y BRCA2

4.1.- FUNCIONES DE BRCA1

4.1.1.- ACTIVIDAD UBIQUITINA-LIGASA

La ubiquitinación es el proceso por el cual una proteína es modificada por unión covalente de cadenas de mono o poliubiquitina (Weissmann et al., 2001). En la reacción intervienen tres enzimas: una activadora (E1), una conjugadora (E2), y una ubiquitina ligasa (E3). El proceso requiere ATP y empieza con la formación de un puente tiol-éster entre una cisteína de la enzima activadora (E1) y la glicina C-terminal de la ubiquitina, de modo que la ubiquitina se une a la E1; después, se transfiere la ubiquitina de la E1 a la enzima conjugadora E2. Finalmente, una ubiquitina-ligasa E3 traspasa la ubiquitina de la E2 a una lisina de la proteína diana. Parece que la E3 primero se autoubiquitina y luego pasa la ubiquitina directamente al sustrato.

La ubiquitinación tradicionalmente se relaciona con marcaje de proteínas para su degradación por el proteasoma, pero recientemente se ha descrito la ubiquitinación como forma de activar o reprimir distintos factores de transcripción.

Las proteínas con dominios funcionales de tipo “RING-finger” suelen presentar actividad ubiquitina-ligasa E3. La proteína BRCA1 presenta en su extremo amino terminal un dominio “RING-finger”, y se comprobó que funcionaba como ubiquitina-ligasa en presencia de enzimas activadora (E1), conjugadora (E2) y ATP. Esta actividad desaparece cuando se introduce una mutación (C61G) en una cisteína conservada del dominio RING (Lorick et al., 1999). Posteriormente se observó que la actividad ubiquitina-ligasa de BRCA1 aumentaba en gran medida al unirse a BARD1. BARD1 es una proteína de conformación similar a BRCA1 y que también posee un dominio RING-finger en su extremo amino. A través de este se une al dominio RING de BRCA1. El heterodímero BRCA1-BARD1 cataliza las reacciones de ubiquitinación “in Vitro” en presencia de E1, E2 y ATP (Hashizume et al., 2001, Brzovic et al., 2003). BRCA1 se autoubiquitina cuando está unido a BARD1, y esto estabiliza a BRCA1 y aumenta su actividad E3 (Hashizume et al., 2001; Nishikawa et al., 2004; Mallery et al., 2002; Baer et al., 2002).

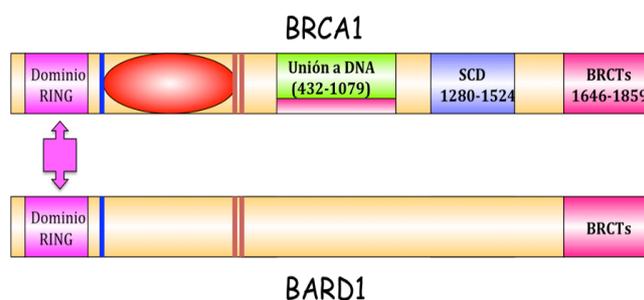


Figura 3: Heterodímero BRCA1-BARD1

Las consecuencias biológicas de la ubiquitinación no están totalmente claras. Dependiendo del tipo de cadena de ubiquitina que se añada, la modificación promueve distintos procesos (Pickart 2004; Mukhopadhyay et al., 2007; Ohta et al., 2004). Habitualmente, las cadenas de ubiquitina se unen a sus sustratos a través de la lisina 48 de la ubiquitina y, de esta forma, los marcan para su degradación por el proteasoma (Chau et al., 1989). También se ha visto “in vivo” que se produce ubiquitinación en las zonas de daño al DNA, como cuando se forman roturas de doble cadena (DSBs) en las horquillas de replicación (Morris J.R., et al. 2004). Se ha visto que la ubiquitinación mediada por BRCA1-BARD1 está relacionada con reparación de DNA (Kleiman et al., 2005; Poole et al., 2006). El dominio BRCT de BRCA1 se une a ciertas proteínas fosforiladas como CtIP, BACH1, y ABRA1 (Manke et al., 2003, Yu et al., 2003). Se ha propuesto que la unión de estas proteínas podría servir para dirigir la actividad ubiquitina-ligasa de BRCA1-BARD1 hacia sustratos

específicos (Wang et al., 2007, Yu et al., 2006). Para que el dímero BRCA1-BARD1 reconozca los sustratos a ubiquitinar, dichas proteínas deben unirse a la zona amino terminal de BRCA1 y, a veces, también al dominio BRCT. Algunas necesitan unirse, además, a BARD1 (Yu et al., 2006; Chen et al., 2002; Kleiman et al., 2005; Starita et al., 2004 y 2005; Sato et al., 2004; Wu et al., 2007; Eakin et al., 2007; Poole et al., 2006; Horwitz et al., 2007).

Además, existen varias enzimas E2 capaces de interactuar con el dominio RING de BRCA1. Dependiendo de la E2 que se una a BRCA1, el tipo de ubiquitinación y el sustrato ubiquitinado serán diferentes (Christensen et al., 2007).

Varios de los sustratos ubiquitinados por BRCA1 han sido identificados: BRCA1 promueve la poliubiquitinación de algunas proteínas como CtIP, TFIIE, RPB8, y NPM1. Estas actúan como mediadores en la reparación del DNA: La ubiquitinación de CtIP podría ser importante para la formación de focos de CtIP en los sitios del daño al DNA, ya que CtIP ubiquitinado se asocia con la cromatina tras exposición a radiación γ (Yu et al., 2006). La ubiquitinación de TFIIE provoca su disociación del complejo de pre-iniciación de la transcripción y bloquea el comienzo de la síntesis de mRNA, probablemente para permitir la reparación del DNA antes de que se transcriba (Horwitz et al., 2007). La ubiquitinación de RPB8 tras exposición a radiación UV podría ser importante para la supervivencia celular asociada a BRCA1 tras el daño al DNA (Wu et al., 2007). El significado biológico de la ubiquitinación de NPM1 se desconoce.

Los sustratos citados en el párrafo anterior son modificados con cadenas de poliubiquitina, pero, además, BRCA1 cataliza la monoubiquitinación de otros sustratos: las histonas H2A, H2B, H3, H4, γ H2AX, y el receptor de estrógenos α (ER α) son monoubiquitinadas por BRCA1 "in Vitro". La γ -tubulina también es monoubiquitinada por BRCA1 "in Vitro" y esto podría regular el número de centrosomas y la adecuada segregación nuclear (Chen et al., 2002; Starita et al., 2004; Mallery et al., 2002).

Por tanto, parece que los sustratos a ubiquitinar por BRCA1 son reclutados hacia los sitios de daño al DNA e intervienen en su reparación a través de los puntos de control del ciclo celular o de la remodelación de cromatina.

Una de las funciones más importantes de BRCA1 es su papel en la reparación de roturas de doble cadena (DSBs) en el DNA. La capacidad como ubiquitina-ligasa de BRCA1 podría participar en el proceso. El modelo propuesto sería como sigue:

En la zona de la rotura, la histona γ H2AX fosforilada aparece para señalar la zona del daño. La proteína MDC1 es fosforilada por la quinasa ATM y se une a dicha histona γ H2AX, la cual es monoubiquitinada por enzimas que se desconocen. Después, al complejo γ H2AX-MDC1 se une RNF8, que es una ubiquitina ligasa E3. RNF8, junto a la E2 Ubc13-Mms2, une moléculas de ubiquitina a las en lisina 6 y 63 a los monómeros ya existentes unidos a γ H2AX o H2A (Mailand et al., 2007; Zhao et al., 2007). Tras haber cumplido su función, MDC1 y RNF8 se retiran. Luego, el dímero RAP80-ABRA1 se une a las cadenas de ubiquitina de γ H2AX y recluta a BRCA1-BARD1 a la zona del DSB. BRCA1-BARD1, junto a la E2 UbcH5c, poliubiquitina en lisina 6 sustratos adicionales cerca de la rotura (Wang et al., 2007; Sobhian et al., 2007). Las cadenas creadas por BRCA1-BARD1 a su vez reclutan a más complejos BRCA1-BARD1 amplificando la señal.

Por último, las cadenas de ubiquitina en lisina 6 reclutan a BRCA2-RAD51 hacia los sitios del daño y se procede a la reparación por recombinación homóloga. En la figura 4 se esquematiza este proceso.

De esta manera, una sucesión de eventos dependientes de ubiquitinación promoverían la reparación de la rotura en el DNA.

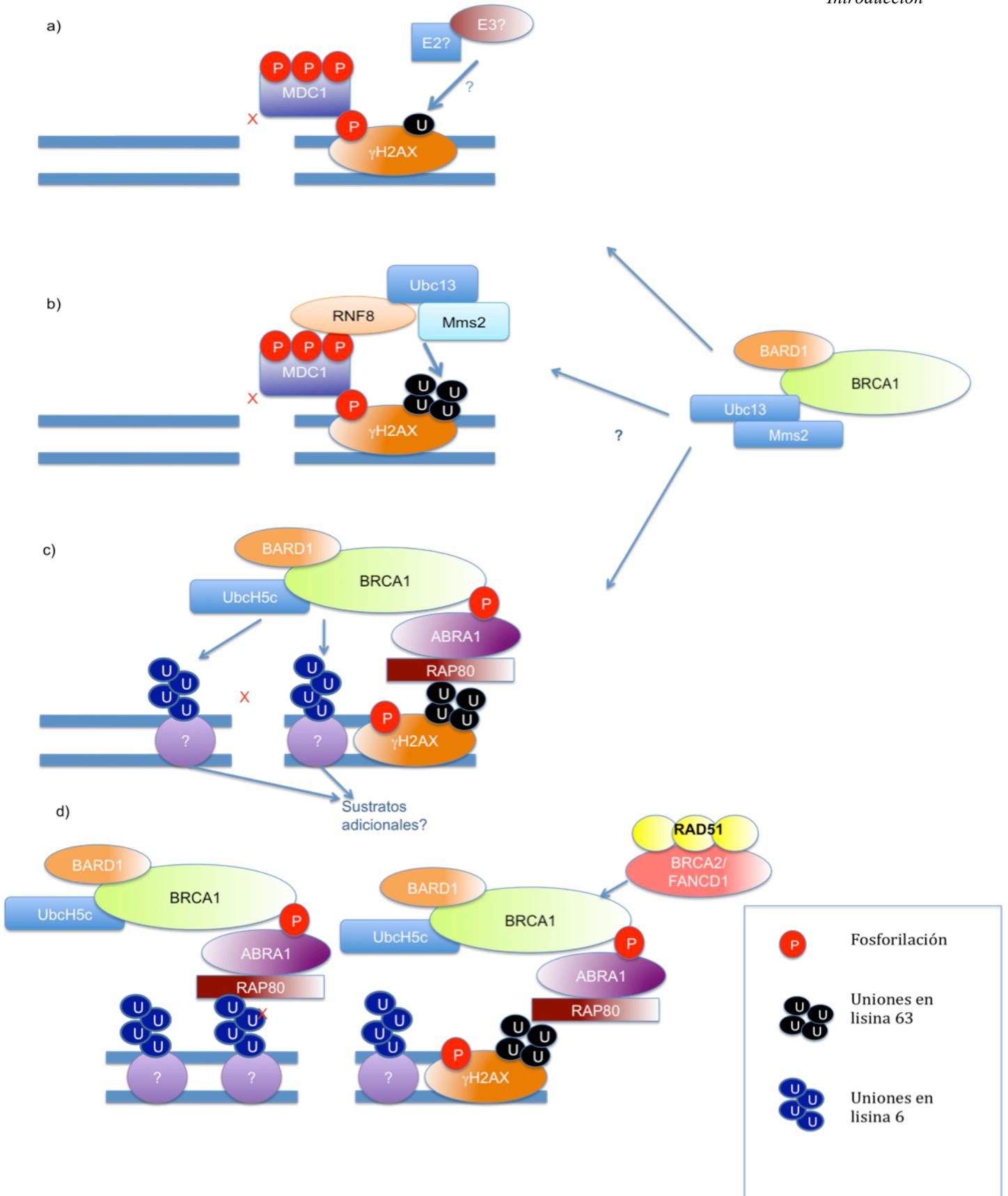


Figura 4: Esquema de la participación de BRCA1 en la señalización y reparación de DSBs mediante ubiquitinación (modificado de Wu et al., 2008).

4.1.2.- REGULADOR TRANSCRIPCIONAL

No todos nuestros genes se expresan a la vez, existe una regulación según la necesidad de determinadas proteínas en cada momento del ciclo. Existen secuencias consenso (que a menudo están en los promotores de los genes) a las que se unen las RNA polimerasas y otros factores reguladores que promueven o inhiben la expresión de dichos genes.

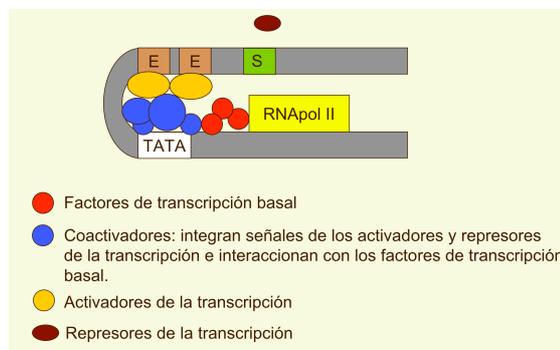


Figura 5: Esquema de los factores que participan en la transcripción de un gen.

BRCA1 es un componente del núcleo de la maquinaria de transcripción, ya que se asocia a la RNA polimerasa II en un gran complejo llamado “RNA polimerasa II holoenzima” (Scully et al., 1997). BRCA1 puede bloquear el inicio de la transcripción ubiquitinando el complejo transcripcional de pre-iniciación, impidiendo la unión estable de factores como TFIIH y TFIIB (Horwitz et al., 2007). Esto podría permitir, en caso de daño al DNA, que este se repare antes de transcribirse.

Además, BRCA1 actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes en la célula (Chapman et al., 1996; Monteiro et al., 1996).

La región carboxilo terminal de BRCA1 contiene dos dominios BRCT que interaccionan con múltiples factores de transcripción promoviendo la activación o represión de diversos genes (Callebaut et al., 1997):

- El segundo dominio BRCT de BRCA1 interacciona con p53 y esta unión promueve la transcripción de los genes p21 y GADD45 (Harkin et al., 1999; Somasundaram et al., 1997; Ouchi et al., 1998, Chai et al., 1999). Existe otro dominio de interacción con p53 a través de los residuos 772-1292 de BRCA1. Esta interacción está implicada en apoptosis y también induce la expresión de p21 (Buck, 2008). La activación de p53 mediada por BRCA1 estimula la parada del ciclo celular, la unión al DNA y su

reparación, e inhibe determinados genes relacionados con apoptosis que son dependientes de p53 (MacLachlan et al., 2002; Buck, 2008).

- BRCA1 también interacciona con el oncogén c-MYC “in Vitro” e “in vivo” a través de los residuos 175-303 y 433-511. Wang et al. observaron que BRCA1 inhibe la transcripción de genes dependientes de c-MYC (como ODC y CDC25A) y lo hace de forma dosis-dependiente. Por otro lado, la sobreexpresión de BRCA1 inhibe la capacidad transformadora de c-MYC y otros oncogenes como H-RAS, quizás también reprimiendo la transcripción de genes aguas abajo de estos (Wang et al., 1998).
- BRCA1 también inhibe la transcripción del receptor de estrógenos α (ER α) y los genes de respuesta al mismo. No obstante, la mayoría de portadores de mutación en BRCA1 expresan de por sí niveles bajos del receptor de estrógenos y de las proteínas aguas abajo en la ruta, por lo que esta inhibición no sería demasiado importante (Fan et al., 1999).

La capacidad de BRCA1 de unirse a enzimas que modifican la cromatina (desacetilasas de histonas HDACs, proteínas asociadas a RB, factores remodeladores como SWI/SNF, BRG1), plantea un mecanismo alternativo por el que BRCA1 podría regular la transcripción a través de modificaciones de la cromatina. La acetilación de histonas se relaciona con activación transcripcional de genes. BRCA1 podría reclutar complejos de desacetilasas “HDACs” hacia promotores específicos reprimiendo la expresión de determinados genes o, a la inversa, BRCA1 podría activar la transcripción desplazando los complejos “HDACs” permitiendo la acetilación y activación (Yarden et al., 1999; Bochar et al., 2000; Neish et al., 1998; Ye et al., 2001).

En individuos homocigotos XX se suele inactivar una de las copias del cromosoma X. Se ha visto que las mutaciones o pérdida de función de BRCA1 alteran este proceso. XIST es una molécula de RNA que recubre el cromosoma X inactivo. En ausencia de BRCA1, XIST no se localiza en el cromosoma X inactivo y deja de silenciarlo. Otros marcadores de zonas de cromatina silenciadas como la histona H2A1 y H3 metilada en lisina 9, también desaparecen del cromosoma X inactivo si BRCA1 no es funcional (Ganesan et al., 2002).

COMPLETARLO O QUITARLO

4.1.3.- REGULADOR DEL CICLO CELULAR

El ciclo vital de la célula está formado por cuatro etapas: G1, S, G2, M (figura 6). En la fase M es cuando se produce la división celular. Cuando una célula se divide, la información genética contenida en su DNA debe duplicarse de manera precisa para posteriormente transmitir una copia a cada célula hija. Este proceso está estrechamente regulado por diversos factores como las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Sherr et al., 1999)..

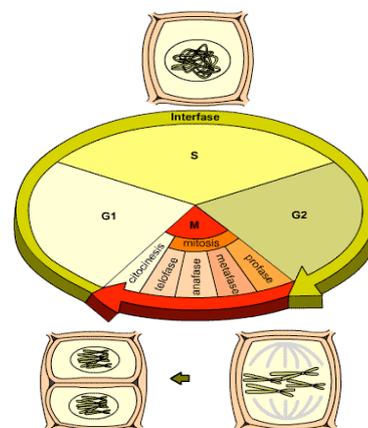


Figura 6: Esquema del ciclo celular

Los puntos de control del ciclo celular (“checkpoints”) son mecanismos de vigilancia que responden al daño en el DNA y detienen el ciclo para que la célula tenga tiempo de repararlo. Estos puntos de control se sitúan entre una fase y otra, y se ponen en marcha cuando hay un daño al DNA activando la transcripción de determinados genes.

BRCA1 es fosforilada en múltiples residuos de serina por las quinasas que detectan el daño al DNA, como ATM, ATR y CHEK2, durante las fases G1 tardía y S del ciclo celular. (Venkitaraman et al., 2002; Chen et al., 2000; Cortez et al., 1999; Tibbetts et al., 2000; Lee et al., 2000). Parece que según el sitio fosforilado se dirige la función de BRCA1: Se ha comprobado que la fosforilación en serina 1387 es esencial para detener el ciclo en respuesta a radiación ionizante, mediante la activación del punto de control de la fase S; y la fosforilación en las serinas 1423 y 1524 activa la ruta de apoptosis en respuesta a radiación UV (Chiba et al., 2001; Xu et al., 2001 y 2002). Además, BRCA1 regula la expresión y localización de otras proteínas que funcionan en la ruta:

Ante una señal de daño al DNA, el punto de control de la transición G1-S se pone en marcha para que el ciclo se detenga y el DNA sea reparado. El dominio BRCT de BRCA1 cuando no está fosforilado está unido a CtIP/CtBP, impidiendo su unión a otros factores (Li et al., 1999). En respuesta al daño en el DNA, BRCA1 se hiperfosforila y se libera de CtIP/CtBP, lo que le permite activar la expresión del gen p21 (Somasundaram et al., 1997). P21 inhibe al complejo CDK2-ciclina A/E (que promueve el avance del ciclo), impidiendo

así el paso de G1 a S. Por otro lado, BRCA1 es necesario para la fosforilación y activación, vía ATM/ATR, de proteínas como p53, que son necesarias para la mencionada activación de p21 y la parada del ciclo (Foray et al., 2003; Fabbro et al., 2004).

BRCA1 también se ha relacionado con el punto de control de G2-M. En condiciones normales, cuando las células se aproximan a la fase M se activa Cdc25, la cual a su vez activa al complejo Cdc2-ciclinaB para que continúe el ciclo. En respuesta al daño en el DNA, BRCA1 activa genes que inhiben esta transición: 14-3-3 σ se une a Cdc25c y lo secuestra sacándolo del núcleo, GADD45 secuestra a Cdc2 y lo separa de la ciclina B, y la actividad quinasa de Cdc2-ciclinaB puede ser reprimida directamente por BRCA1 o a través de 14-3-3 σ y p21. (Zhan et al., 1999; Mullan et al., 2001; Fan et al., 2002).

BRCA1 también participa en el punto de control de la mitosis (fase M). Ante el daño en el DNA, en la fase M del ciclo BRCA1 y Oct1 transactivan a MAD2, componente clave en el ensamblaje del huso mitótico. MAD2 a su vez inhibe a APC, lo que induce la parada del ciclo celular antes de que finalice la mitosis evitando que las células hijas hereden una copia dañada del DNA (Wang et al., 2004).

Cuando las células carecen de BRCA1 funcional, los puntos de control del ciclo no funcionan correctamente; el ciclo progresa y hay división celular aunque se produzca daño al DNA, de forma que se transmite la lesión a las células hijas, lo que, a larga, da lugar a inestabilidad genómica y puede desembocar en la aparición del cáncer.

4.1.4.- REPARACIÓN DE DNA

La reparación eficiente del daño al DNA radica en la existencia de una compleja red de señalización celular que integra tres procesos generales: detección del daño, parada del ciclo celular y reparación propiamente dicha. Si el daño es demasiado extenso como para arreglarlo, la célula activa la ruta de apoptosis o senescencia.

Si alguno de los componentes del sistema falla y el DNA no se repara correctamente, esto puede dar lugar a inestabilidad genómica y puede provocar la aparición de cáncer.

Se ha observado que las células deficientes en BRCA1 son más sensibles a radiación ionizante y muestran inestabilidad cromosómica y aberraciones génicas, probablemente como consecuencia de su incapacidad para reparar el DNA correctamente (Shen et al., 1998; Xu et al., 1999).

Existen seis rutas principales de reparación de DNA (figura 7). Se ha comprobado que BRCA1 participa en tres de las mismas: escisión de nucleótidos (NER), unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga (HR).

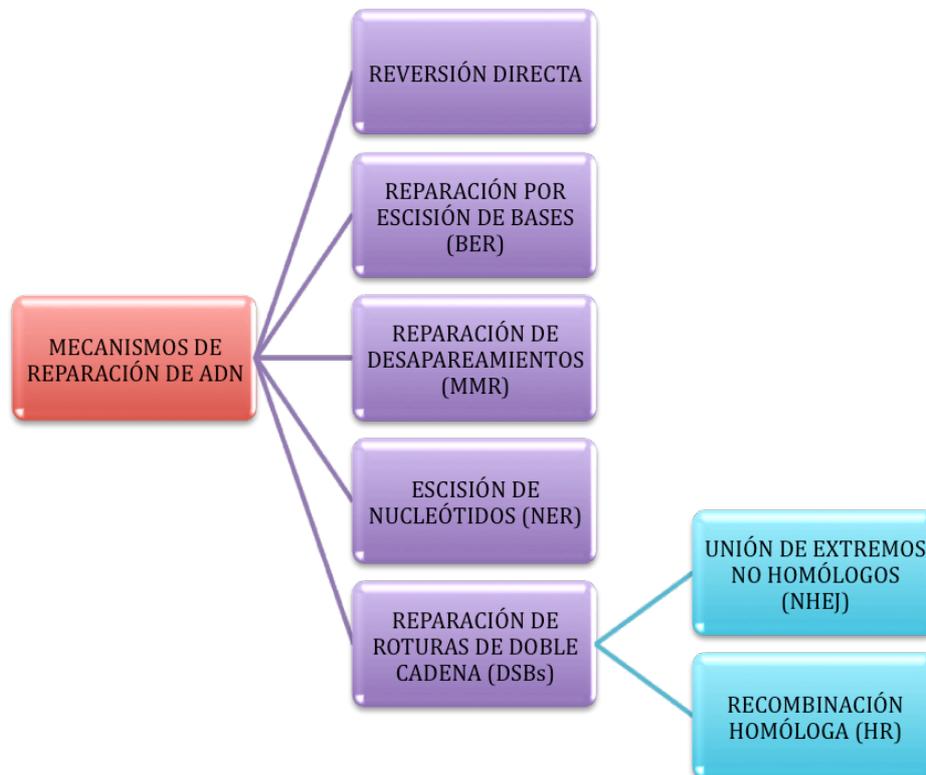


Figura 7: Rutas de reparación de DNA

A) REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER):

Mediante esta ruta se reparan los daños causados por radiación UV, mutágenos químicos, humo de tabaco o drogas quimioterapéuticas (Leibeling et al., 2006). Los errores más típicos que se corrigen vía NER son los dímeros de pirimidinas, la 8,5-ciclo-2-desoxiadenosina y la 8-oxoguanina. Existen dos subrutas de NER: la global (GG-NER), que detecta y elimina las lesiones de todo el genoma, y la acoplada a la transcripción (TC-NER), que funciona sólo con los genes transcripcionalmente activos. En ambas, primero se reconoce el daño y se ensambla un complejo de proteínas en la zona, después se realizan dos cortes en la hebra dañada que flanquean el error y, finalmente, se elimina el oligonucleótido que

contiene la lesión. El hueco se rellena por una DNA polimerasa con un oligonucleótido complementario a la hebra preexistente y el nuevo fragmento se sella con una ligasa.

Se ha demostrado que las células deficientes en BRCA1 son incapaces de reparar las lesiones oxidativas de 8-oxoguanina mediante la ruta NER acoplada a la transcripción, recuperándose la capacidad reparadora al expresar la proteína germinal (Le Page et al., 2000). La eliminación de la 8-oxoguanina en la hebra transcrita es estrictamente dependiente de un proceso TC-NER activo. Para llevarlo a cabo, BRCA1 debe intervenir en sinergia con CSB, XPG, XPB y XPD pero no se sabe en qué paso en concreto. La interacción entre BRCA1 y la RNA polimerasa II, así como con los factores de transcripción basal TFIIIF, TFIIIE, TFIIH podrían implicar un bloqueo de la RNA polimerasa II que detenga la transcripción para que la reparación tenga lugar.

Por otro lado, tras la exposición a radiación UV se ha visto que el complejo BRCA1-BARD1 ubiquitina específicamente una subunidad de la RNA polimerasa II provocando su posterior degradación, lo que daría tiempo suficiente a la maquinaria de reparación para actuar mientras está totalmente detenida la transcripción, y permitiría la eliminación de los transcritos terminados prematuramente que darían lugar a proteínas truncadas (Kleiman et al., 2005; Starita et al., 2005).

Además, las proteínas implicadas en reparación de desapareamientos también tienen un papel en NER. BRCA1 interacciona con MSH2 y MSH6. MSH2 y MSH6 se ha visto que intervienen en la reparación de errores en la hebra transcrita a través del TC-NER (Wang et al., 2000).

BRCA1 también podría intervenir en el GG-NER al inducir la expresión de genes relacionados con la ruta como XPC, DDB2 y GADD45 (Harkin et al., 1999; Hartman et al., 2002).

B) REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA (DSBs: “double strand breaks”):

Las roturas de doble cadena (DSBs) constituyen una seria amenaza para la viabilidad celular y la estabilidad genómica. Pueden surgir de forma natural cuando las horquillas de replicación se encuentran con lesiones que las bloquean (como las producidas por las especies de oxígeno reactivo), en la recombinación somática y la meiosis, y por estrés físico

durante la separación de los cromosomas en la mitosis. También pueden deberse a agentes exógenos como la radiación ionizante, agentes químicos y radiación UV, y drogas quimioterapéuticas.

El fracaso a la hora de reparar los DSBs puede resultar en muerte celular o grandes reordenamientos cromosómicos que aumentan la inestabilidad genómica y potencian la transformación neoplásica.

Las células eucariotas reparan los DSBs principalmente a través de dos mecanismos: Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (HR). BRCA1 participa en ambos mecanismos.

- UNIÓN DE EXTREMOS NO HOMÓLOGOS (NHEJ)

Es el mecanismo más simple para reparar un DSB y no está exento de errores. En general, es preciso para las roturas caracterizadas por extremos romos que pueden surgir cuando un duplex de DNA se fractura en dos partes. Para reparar este tipo de DSBs, primero, el heterodímero de proteínas ku70/ku80 se une a los extremos de la rotura formando un anillo. El complejo DNA/kus recluta y activa a la quinasa DNA-PKcs. Las PKcs yuxtaponen los extremos, que son ligados mediante la ligasa IV, XRCC4 y XLF. Esta ruta dependiente de ku70/ku80 permite una reparación precisa del DSB. Pero también existen roturas que dan lugar a extremos incompatibles que impiden la reparación directa. En este caso es necesario un procesamiento previo de los extremos. El complejo MRN (MRE11,RAD50,NBS1) actúa como nucleasa eliminando las secuencias que flanquean el DSB hasta obtener extremos compatibles. Este proceso suele introducir pequeñas inserciones y pérdidas y da lugar a una reparación imprecisa y propensa al error.

Las células deficientes en BRCA1 muestran defectos en NHEJ tras radiación ionizante (Scully et al., 1999). No está muy claro cómo BRCA1 participa en el NHEJ. Existe un estudio en que muestran que BRCA1 inhibe el procesamiento de los extremos vía MRN: se comprobó que la unión de BRCA1 al DNA inhibe la capacidad de MRN (o MRE11 sola) de funcionar como nucleasa. Si la ruta de MRN no es funcional, esto llevaría a escoger la ruta de Ku/PKcs, que es más precisa. (Paull et al., 2001).

La fosforilación de BRCA1 por Chk2 en S988 interviene en el proceso, minimizando el tamaño de las pérdidas introducidas por la reparación. Este residuo de serina 988 se encuentra en la zona de unión al DNA de BRCA1 y podría estar implicada en la inhibición de MRE11 (Zhuang et al., 2006; Wang et al., 2006).

En conjunto, estos resultados indican que BRCA1 promueve la estabilidad genómica maximizando la fidelidad de NHEJ. También es posible que BRCA1 regule la elección de la ruta a seguir, pero no existen evidencias directas que apoyen esta hipótesis.

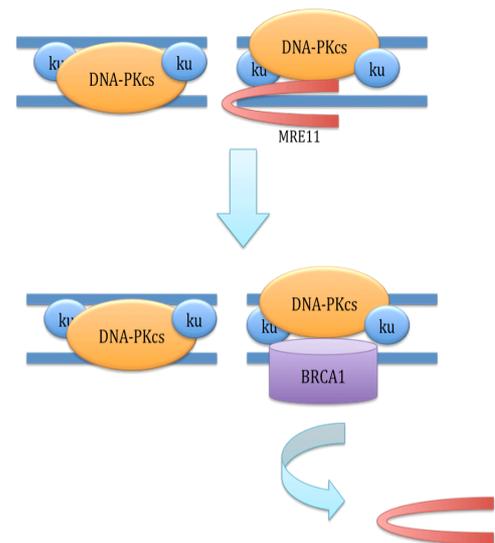


Figura 8: Regulación de NHEJ por BRCA1

- RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HR)

La recombinación homóloga es un proceso que tiene lugar en todas las formas de vida. Sus funciones van más allá de la reparación de DNA: evita el estancamiento de las horquillas de replicación, orquesta la segregación de los cromosomas homólogos en la meiosis y participa en el mantenimiento de los telómeros.

La disfunción en HR o su pérdida total, se asocia con distintas enfermedades de predisposición al cáncer y es, posiblemente, la causa primigenia de los tumores en pacientes con BRCA mutado.

La HR es catalizada por una clase de enzimas llamadas recombinasas. Mutaciones en los genes que las codifican y en los factores relacionados, provocan hipersensibilidad a agentes genotóxicos, especialmente los que crean DSBs (radiación ionizante, agentes entrecruzantes...).

La reparación de DSBs por HR implica a diversas proteínas: RAD51, XRCC2, XRCC3, RAD52, RAD54, RPA, WRN, BLM ...etc. De entre ellas es de especial

importancia RAD51, recombinasa encargada de la recombinación mitótica para la reparación de DSBs y otras lesiones del DNA.

Dentro de HR, se han descrito varias subrutas de reparación:

- **CONVERSIÓN GÉNICA (GC):** utiliza una secuencia homóloga, preferiblemente en la cromátida hermana, como molde para resintetizar la secuencia que rodea al DSB y suele desembocar en una reparación muy precisa de la rotura. La GC depende de RAD51, el complejo MRN, RPA, BRCA2 y otros factores. Este tipo de reparación incluye el mecanismo clásico que resuelve los DSBs.
- **ANILLAMIENTO DE CADENA SENCILLA (SSA o single-strand annealing):** También requiere secuencias homólogas, pero es independiente de RAD51 e implica el anillamiento de las hebras sencillas de DNA que surgen tras el corte a nivel del DSB. El mecanismo concreto no está muy claro. Esta ruta tiende a cometer errores, ya que retiene una de las secuencias homólogas y la otra se pierde.
- **REPLICACIÓN QUE INDUCE RUPTURA (BIR: break-induced replication):** Sólo un extremo del DSB es capaz de realizar HR: se forma una especie de horquilla de replicación en la que se copia el brazo distal entero del cromosoma molde. De esta forma, el otro brazo no participa y ese fragmento se pierde. Este sistema parece ser uno de los responsables del alargamiento de los telómeros.

BRCA1 y BRCA2 participan sobre todo en la conversión génica, que es la ruta más precisa dentro de la recombinación homóloga.

Uno de los primeros indicios de que BRCA1 estaba implicada en reparación fue la observación de que BRCA1 se une y colocaliza con la recombinasa RAD51 en focos nucleares junto a BRCA2 y BARD1, formando el llamado complejo BRCC (Scully et al., 1997; Jin et al., 1997; Dong et al., 2003). Sin embargo, mientras que BRCA2 tiene un papel directo y muy importante en la HR, la función de BRCA1 no está muy clara. Se ha visto que células embrionarias de ratón deficientes en BRCA1 tienen afectada la reparación de DSBs vía GC, por lo que debe participar de alguna manera en el proceso (Moynahan et al., 1999,2001). Además, BRCA1 es necesaria para la formación de focos nucleares de RAD51

tras el daño al DNA (Bhattacharyya et al., 2000). Por otro lado, la reparación por recombinación homóloga vía SSA también se ve reducida en las células deficientes en BRCA1, por lo que BRCA1 podría actuar aguas arriba en la decisión entre SSA y GC (Stark et al., 2004).

BRCA1 colocaliza con el complejo MRN en focos tras daño al DNA. BRCA1, MRN y otras proteínas forman un macro-complejo llamado BASC que está relacionado con la reparación de DSBs mediante NHEJ y HR (vía GC y SSA) (Zhong et al., 1999; Wang et al., 2000; Paull et al., 2001). NHEJ y HR compiten por la reparación de DSBs, con NHEJ actuando principalmente en las fases G0, G1 y S temprana del ciclo; y HR en fase S tardía y G2 (Shrivastav et al., 2008).

4.2.- FUNCIONES DE BRCA2

4.2.1.- REGULADOR TRANSCRIPCIONAL

La región de BRCA2 codificada por el exón 3 es capaz de estimular la transcripción en células de mamífero. Este dominio de activación es bipartito: existe una región primaria activadora, que comprende los residuos 18 al 60 de la proteína y una región auxiliar que abarca los residuos 60 al 105. Esta región auxiliar presenta homología con el factor de transcripción C-JUN. Los residuos 18-141 de BRCA2 se fosforilan “in vivo” por alguna quinasa celular que se une específicamente a esa región (Milner et al., 1997). La quinasa que fosforila a BRCA2 en su región activadora es EMSY: los residuos 1 al 80 de EMSY se unen a la zona del aminoácido 18 al 60 de BRCA2. EMSY es exclusivamente nuclear, capaz de unirse a complejos remodeladores de cromatina y sus residuos 1 al 478 inhiben a BRCA2. Por tanto, EMSY es una proteína represora que se une al dominio de activación del extremo amino terminal de BRCA2 e inhibe específicamente la activación transcripcional debida a este (Milner et al., 1997, 2000; Hughes-Davies et al., 2003).

La importancia del dominio de transactivación de BRCA2 se puso de manifiesto al encontrarse una mutación patogénica que elimina el exón 3 en una familia de cáncer de

mama y ovario hereditario. Esta mutación afecta al sitio clásico de procesamiento provocando la eliminación completa del exón 3. Otra deleción en el intrón 2 que provoca la pérdida del exón 3 entero fue encontrada en carcinoma de endometrio (Nordling et al., 1998; Koul et al., 1999). Por otro lado, la introducción de una mutación puntual que aparece en cáncer de mama hereditario (Y42C), en la región activadora, elimina el potencial activador de BRCA2 (Milner et al., 1997).

Por otro lado, el dominio de transactivación de BRCA2 podría estar implicado también en reparación de DNA puesto que dicho dominio activador de BRCA2 se une a la proteína de replicación A (RPA), una proteína de unión a DNA de cadena sencilla que participa en reparación de DNA. Esta unión se ve drásticamente reducida al introducir la mutación Y42C (Wong et al., 2003).

El dominio de transactivación actúa sobre diversos genes diana. BRCA2 reprime la actividad transcripcional de p53. Esta represión podría servir para limitar la duración o severidad de la parada del ciclo debida a p53 por daño en el DNA (Marmorstein et al., 1998).

Otro gen diana sería el factor de transcripción SMAD3, el cual se ha visto que interacciona directamente con BRCA2 y ambos sinergizan en la activación transcripcional de uno y otro (Preobrazhenska et al., 2002).

La acetilación de histonas es un evento característico de la cromatina transcripcionalmente activa, una forma de activar la expresión génica. BRCA2 interacciona directamente a través de su región amino terminal (residuos 290-453) con la acetiltransferasa de histonas P/CAF. Esta interacción se ha comprobado “in Vitro” e “in vivo”. Además, se ha visto que BRCA2 posee actividad acetilasa de histonas cuando está unida a P/CAF, por lo que actuaría en la activación transcripcional vía acetilación (Fuks et al., 1998; Siddique et al., 1998).

Por otro lado, BRCA2 coopera sinérgicamente con P/CAF y BRCA1 para promover la transactivación del receptor de andrógenos (AR) dependiente de GRIP1. El receptor de andrógenos está implicado en inhibición de la proliferación celular debida a los estrógenos y también inhibe la proliferación de algunas líneas de cáncer de mama. Por ello, la pérdida de BRCA2 provocaría la pérdida del efecto inhibitorio de AR y podría en última instancia desembocar en tumorigénesis (Shin et al., 2003).

4.2.2.- REPARACIÓN DE DNA:

A) BRCA2 Y LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

BRCA2 tiene un papel directo y relevante en reparación de roturas de doble cadena (DSBs) por recombinación homóloga (HR).

Entre los mecanismos de HR, BRCA2 es muy importante en la conversión génica (GC), que es el más preciso de ellos.

La HR se inicia en los extremos del DSB, donde se eliminan los extremos de las hebras 5' a 3' de forma que se obtienen colas de DNA 3' de cadena sencilla (ssDNA). Las colas de ssDNA resultantes se recubren por moléculas de proteína RPA. Después, BRCA1 promueve que moléculas de RAD51 reemplacen a RPA cubriendo el ssDNA. RAD51 polimeriza en el ssDNA hasta formar un filamento de proteína helicoidal alrededor del DNA. RAD51 está activa en la forma de filamento, pero no como monómero.

El filamento de nucleoproteína de RAD51 busca una secuencia homóloga (normalmente la cromátida hermana o el cromosoma homólogo). Una vez encontrada, RAD51 se disocia del ssDNA permitiendo el apareamiento de bases correcto entre la hebra invasora y la complementaria molde. El extremo 3' que ha anillado es extendido por la polimerasa hasta que se recupera la secuencia perdida. Una vez que la síntesis del fragmento roto se completa, se libera el extremo recién sintetizado. Para finalizar, las resolvasas (helicadas y topoisomerasas) descruzan y cortan las hebras devolviendo la conformación adecuada al DNA (Sung et al., 2006; Li et al., 2008).

El proceso es complejo y está esquematizado en la figura 9.

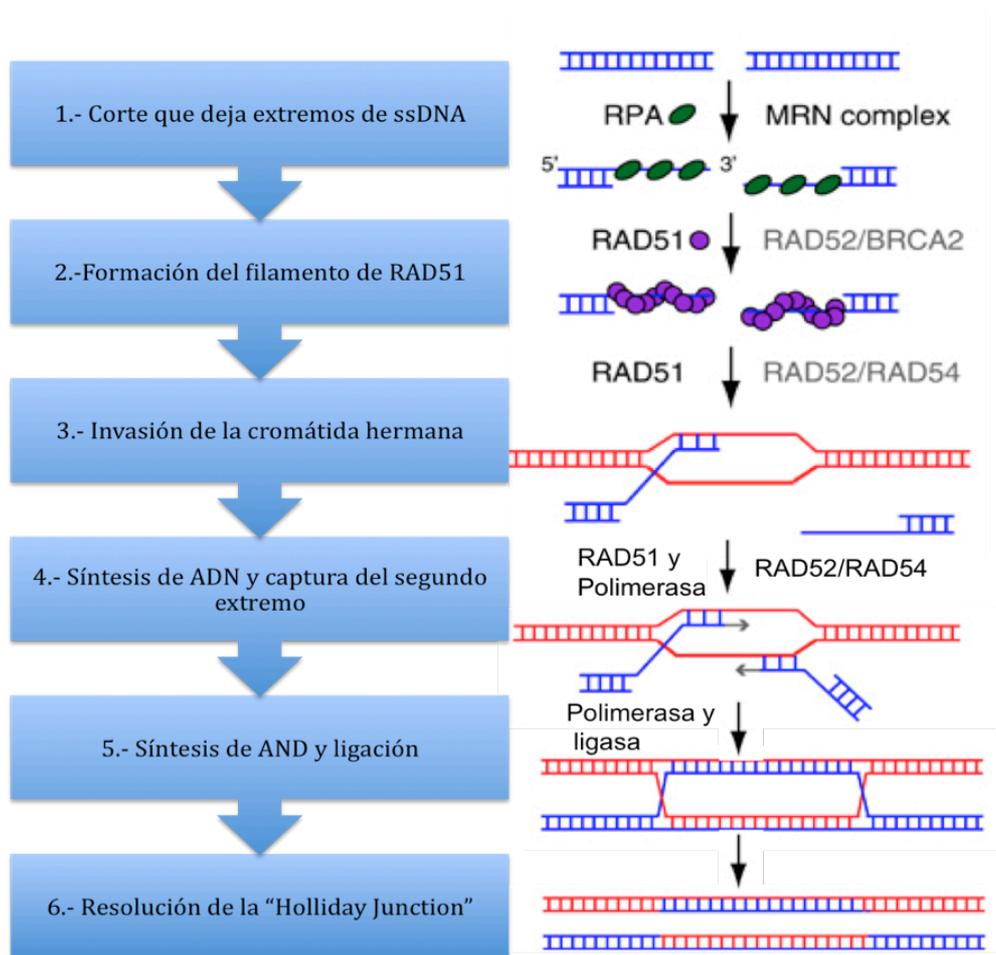


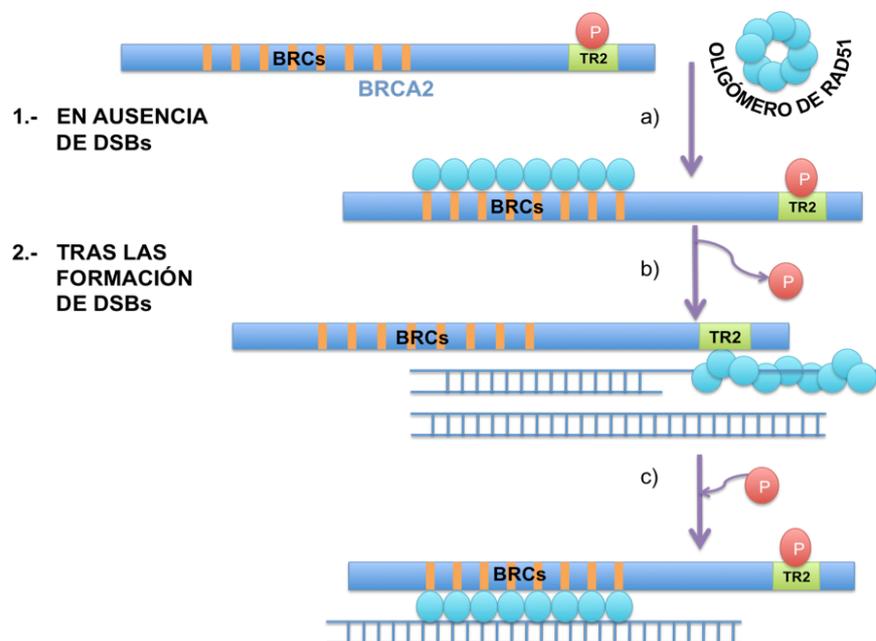
Figura 9: Proceso de la recombinación homóloga a través de RAD51 y BRCA2. En el paso 5 se observan las "Holliday junctions" (modificado de Thorslund et al., 2007).

La implicación de BRCA2 en el proceso de HR se insinuó a partir de la observación de que RAD51 y BRCA2 colocalizan en focos nucleares de células somáticas tras tratarlas con radiación ionizante. La formación de estos focos tras el daño al DNA es dependiente de la presencia de BRCA2 funcional (Sharan et al., 1997; Yuan et al., 1999; Tarsounas et al., 2004). Además, la interacción directa se comprobó por co-inmunoprecipitación (Chen et al., 1998; Marmorstein et al., 1998). De acuerdo con esto, las células deficientes en BRCA2 no forman focos con RAD51 y exhiben un fenotipo de inestabilidad genómica espontánea debido a su deficiencia en HR que implica la aparición de roturas cromosómicas y otras aberraciones (Patel et al., 1998; Yuan et al., 1999; Yu et al., 2000; Moynahan et al., 2001; Tutt et al., 2001).

La proteína BRCA2 humana contiene 8 dominios BRC, que son secuencias repetitivas degeneradas de unos 70 aminoácidos cada uno. RAD51 interacciona directamente con estos dominios, con distintas afinidades por cada uno. Se descubrió que el dominio BRC4 de BRCA2 podía deshacer los filamentos de RAD51 (Davies et al., 2007; Esashi et al., 2007; Galkin et al., 2005). Por otro lado, RAD51 también interacciona con una región en el carboxilo terminal de BRCA2 llamada TR2 (Mizuta et al., 1997; Sharan et al., 1997). La región TR2, cuando no está fosforilada, puede unirse y estabilizar los filamentos de RAD51 ya existentes y activos en la reparación. En resumen, cuando no es necesaria la recombinación, la fosforilación de BRCA2 en S3291 bloquea la unión de los filamentos a la zona TR2, dejándolos desprotegidos frente a la desestabilización de los BRCs. Los filamentos se deshacen y los monómeros de RAD51 se unen al dominio BRCs. Cuando surgen los DSBs, TR2 se desfosforila y promueve la polimerización de RAD51.

Por tanto, ambas regiones de BRCA2 promoverían una respuesta coordinada dependiente de la aparición de DSBs y la fase del ciclo (Davies et al., 2007; Esashi et al., 2005 y 2007).

Figura 10: Modelo de regulación de RAD51 por BRCA2. a) Las repeticiones BRCs de BRCA2 deshacen el oligómero de RAD51 y se unen a los monómeros. b) La Ser3291 de la región TR2 se desfosforila e interacciona con los monómeros de RAD51 promoviendo la formación del filamento de nucleoproteína. c) Tras la recombinación homóloga, la región TR2 se fosforila de nuevo y pierde afinidad por RAD51. Los BRCs se unen al filamento de nucleoproteína y lo deshacen uniéndose a los monómeros de RAD51 (modificado de Lord and Ashworth, 2007).



BRCA2 dirige a RAD51 hacia las colas de ssDNA generadas en los DSBs y facilita su unión y polimerización en torno al DNA. Parece que BRCA2 también se requiere para el transporte de RAD51 al interior del núcleo, ya que BRCA2 tiene señales de localización nuclear (NLS) pero RAD51 no (Spain et al., 1999; Davies et al., 2001).

DSS1 es una proteína de 70 aminoácidos altamente conservada que interacciona con la región DBD (“DNA/DSS1 binding domain”) del carboxilo terminal de BRCA2 (Crackower et al., 1996; Marston et al., 1999). El dominio DBD consta de 5 subdominios, y DSS1 interacciona con numerosos residuos conservados de tres de ellos: el subdominio helicoidal, el OB1 y OB2 (Yang et al., 2002). Los mutantes para DSS1 muestran sensibilidad extrema a radiación UV e ionizante, y deficiencias en recombinación mitótica y meiótica. DSS1 es necesaria para la formación de focos de RAD51 y la estabilización de BRCA2 (Gudmundsdottir et al., 2004; Li et al., 2006).

B) BRCA2 Y LA RUTA DE LA ANEMIA DE FANCONI (FA)

La anemia de Fanconi (FA) es un desorden genético autonómico recesivo ligado al cromosoma X. La enfermedad se caracteriza por malformaciones congénitas, deterioro progresivo de la médula ósea y mayor susceptibilidad al cáncer. Las células de los pacientes con FA muestran inestabilidad cromosómica y mayor sensibilidad a los mutágenos (Joenje et al., 2001).

La FA es una enfermedad genéticamente heterogénea, ya que se han descrito 13 grupos de complementación. Los más frecuentes son el A (60% de los pacientes), B (15%) y C (10%). Las 13 proteínas de FA pueden dividirse funcionalmente en tres grupos: El primero consta de 10 proteínas, que conforman el complejo central y se activan en respuesta al daño en el DNA. Este complejo central interacciona con el DNA para anclarse a los sitios del daño y proceder a la reparación. En el segundo grupo están FANCD2 y FANCI, que interaccionan la una con la otra formando el complejo “ID”. Estas dos proteínas son monoubiquitinadas por el complejo central (Ciccía et al., 2007; Ling et al., 2007) y reclutadas hacia la cromatina formando focos nucleares (Timmers et al., 2001; Smogorzewska et al., 2007). La formación de estos focos depende del complejo central, BRCA1, ATR y la histona γ H2AX (García-Higuera et al., 2001; Bogliolo et al., 2007). FANCD2 también participa en la ruta de

reparación de DSBs vía ATM (Niedzwiedz et al., 2004; Taniguchi et al., 2002). El tercer grupo lo forman BRCA2 (FANCD1), FANCN (PALB2) y FANCI (BRIP1 o BACH1). El complejo BRCA2 (FANCD1)-FANCN (PALB2) se asocia a RAD51 y participa en la recombinación homóloga (Howlett et al., 2002; Xia et al., 2006). FANCI podría promover el salto del error por translesión (Peng et al., 2007).

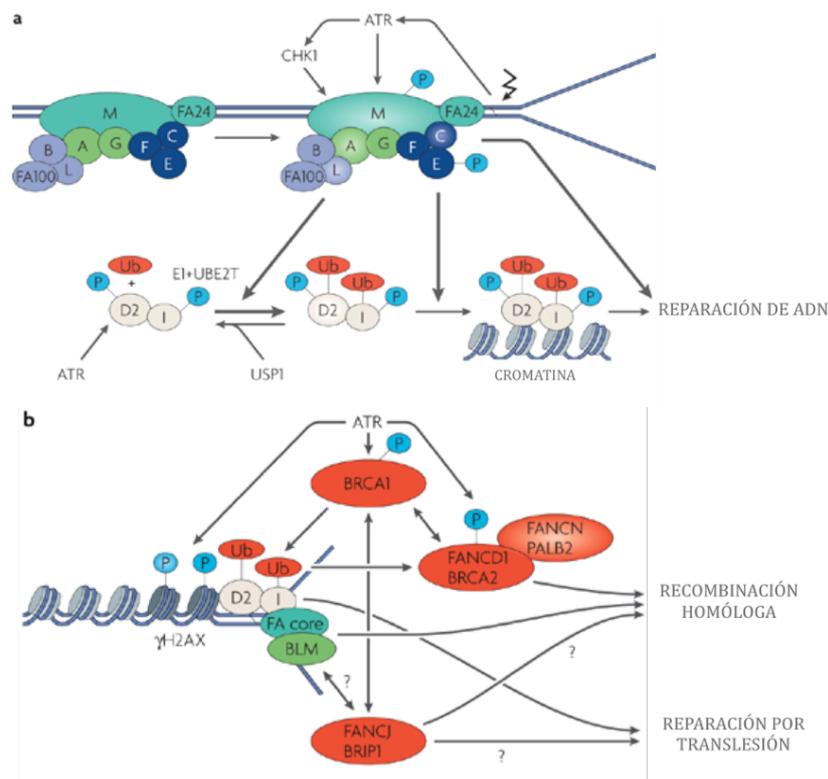


Figura 11: Esquema de la ruta de la anemia de Fanconi, proteínas que participan en la misma y respuestas que provocan (modificado de Wang et al., 2007)

Por otro lado, las proteínas FA interaccionan con otros miembros de la reparación que activan la red FA/BRCA facilitando la fosforilación, estabilizando las horquillas de replicación o reclutando otros factores a las zonas del daño (Pichierri et al., 2004; Taniguchi et al., 2002; Thompson et al., 2005).

Quedan pendientes muchos interrogantes sobre la ruta FA-BRCA, pero no es sino una aproximación diferente a los mecanismos de reparación en los que interviene BRCA2 (Wang et al., 2007).

4.2.3.- BRCA2 Y REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

BRCA2 media en el punto de control G2/M del ciclo celular a través de su interacción con diversos factores como la proteína de unión a DNA BRAF35 (“BRCA2-associated factor 35”). Se une a ella a través de los dominios BRCs 6, 7 y 8. BRAF35 y BRCA2 colocalizan en cromosomas mitóticos y cuando se bloquea cualquiera de las dos se impide la entrada en mitosis (Marmorstein et al., 2001). BRCA2 también interacciona con el factor BUBR1, que es importante para la unión correcta de los cromosomas al huso acromático (Futamura et al., 2000). En células deficientes en BRCA2, la inactivación de BUBR1 o BUB1 provoca la invalidación del punto de control de mitosis e induce la transformación neoplásica en dichas células (Lee et al., 1999).

BRCA2 es hiperfosforilada en su región amino terminal específicamente en la fase M del ciclo y se desfosforila cuando acaba la mitosis y la célula entra en interfase. La quinasa mitótica Plk1 interacciona y fosforila a BRCA2 “in vivo”. Esta fosforilación se correlaciona con la disociación de BRCA2 y P/CAF, y podría servir para evitar la entrada prematura de la célula en mitosis y asegurar la correcta segregación de los cromosomas. No obstante, la función precisa del complejo BRCA2-P/CAF en mitosis aún no se ha descubierto (Lin et al., 2003; Lee et al., 2004).

La importancia de BRCA2 en el punto de control de la mitosis se confirmó al comprobar que su ausencia se relaciona con amplificación de centrosomas y formación de micronúcleos, ambas estructuras anormales que contienen DNA (Tutt et al., 1999). Estas anomalías podrían ser la causa de la aneuploidía e inestabilidad cromosómica vistas en células deficientes en BRCA2.

5.- OTROS GENES DE PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER DE MAMA

A pesar de que las mutaciones en BRCA1/2 son la causa principal del cáncer de mama y ovario hereditario, no explican el 100% de las familias con alto riesgo de cáncer de mama, por lo que las agregaciones familiares sin mutación en BRCA1/2 podrían deberse a mutaciones en otros genes. Esto podría suceder a través del efecto combinado de varios genes de baja penetrancia o a un alelo recesivo o dominante de otros genes de alta penetrancia que

confieren un alto riesgo. Los genes de alto riesgo son la causa principal de las agregaciones familiares de cáncer de mama y a menudo aumentan el riesgo de otros tipos de cáncer.

5.1.- GENES DE ALTA PENETRANCIA

5.1.1.- p53

El gen p53 es un conocido supresor de tumores que codifica una proteína implicada en la regulación de proliferación, ciclo celular, apoptosis y reparación de DNA (Pluquet et al., 2001; Malkin et al., 1990).

El síndrome Li-Fraumeni se caracteriza por múltiples tumores primarios en niños y adultos jóvenes, con predominancia de cáncer de mama entre otros. Las mutaciones que inactivan p53 aparecen en el 70% de las familias que cumplen los criterios de inclusión en el síndrome Li-Fraumeni. La susceptibilidad al cáncer en estas familias sigue un patrón de herencia autosómico dominante, y aquellas con mutación germinal en p53 tienen una probabilidad de desarrollar un cáncer invasivo del 50% a los 30 años. Se estima que más del 90% de los portadores de mutación en p53 desarrollarán un cáncer hacia los 70 años (Frebourg et al., 1995; Birch et al., 1994; Varley et al., 1997; Strong et al., 1992). Se calcula que el cáncer de mama en los pacientes de Li-Fraumeni tiene una penetrancia estimada para los portadores del 28-56% hacia los 45 años (Chompret et al., 2000; Garber et al., 1991).

No suelen encontrarse mutaciones germinales en p53 en familias seleccionadas solamente con cáncer de mama y/o ovario, y muy raramente en los casos en mujeres jóvenes con cáncer de mama (<0,5%) (De Jong et al., 2002; Borresen et al., 1992).

5.1.2.- PTEN

El síndrome de Cowden es un desorden autosómico dominante poco frecuente, que se caracteriza por un alto riesgo de cáncer de piel, mama, útero y tiroides entre otros. Esta enfermedad tiene una frecuencia de 1:300.000 (Mallory 1995).

PTEN es un gen supresor de tumores que aparece mutado en el 80% de las familias con síndrome de Cowden (Nelen et al., 1996; Liaw et al., 1997). Las mujeres portadoras de

mutación en PTEN tienen un riesgo del 25-50% de cáncer de mama a lo largo de la vida (Schweitzer et al., 1999).

No se han encontrado sin embargo mutaciones en PTEN en familias de cáncer de mama hereditario sin el resto de características de síndrome de Cowden (Chen et al., 1998; Carroll et al., 1999).

5.1.3.- LKB1/STK11

Las mutaciones en el gen LKB1/STK11 dan lugar al síndrome de Peutz-Jegher (Westerman et al., 1999). La prevalencia de este síndrome no está muy clara, oscilando desde 1:8.900 a 1:280.000 según los autores. Es un desorden autosómico dominante caracterizado por pólipos en el tracto intestinal y manchas de pigmentación en labios, mucosa bucal y dedos. Los pacientes también presentan un alto riesgo de tumores gastrointestinales, cáncer de mama, páncreas, ovario, útero, pulmón y testículos (Giardello et al., 1987; Spigelman et al., 1989; Boardman et al., 1998).

Las características clínicas de los pacientes con Peutz-Jegher varían entre familias y dentro de ellas; en conjunto la probabilidad de desarrollar un cáncer a la edad de 65 años se estima entre el 29 y 54% (Lim et al., 2003; Giardello et al., 2000).

5.1.4.- CDH1/E-cadherina

La E-cadherina (CDH1) es una proteína implicada en la adhesión célula-célula y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la diferenciación celular y la arquitectura normal de los epitelios.

Las mutaciones germinales truncantes en el gen CDH1 se asocian con el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario (HDGC). El patrón de herencia es autosómico dominante con penetrancia incompleta. El gen CDH1 es un supresor de tumores, y las mutaciones germinales en un alelo suelen ir acompañadas de pérdida de heterocigosidad del alelo restante en el tumor (Bex et al., 2001).

En las familias con HDGC, las mujeres portadoras de mutación en CDH1 tiene un riesgo acumulado del 83% de desarrollar un cáncer gástrico difuso a la edad de 80 años.

Asimismo, el riesgo de cáncer de mama en estas mujeres se estima en el 20-40% a lo largo de la vida (Pharoah et al., 2001; Chan et al., 2001; Graziano et al., 2003).

La mayoría de tumores de mama que aparecen en las familias con HDGC son del tipo lobular, por lo que se recomienda la búsqueda de mutaciones en CDH1 o bien cuando existe un individuo con cáncer gástrico difuso y menos de 35 años, o bien para familias con múltiples casos de cáncer de mama lobular, con historia familiar de cáncer gástrico u otras neoplasias gastrointestinales (Suriano et al., 2005; Keller et al., 1999). Sin embargo, en otros estudios no se han detectado mutaciones germinales en CDH1 en familias de cáncer de mama hereditario (Jonsson et al., 2002; Salahsor et al., 2001).

5.2.- GENES DE BAJA PENETRANCIA

5.2.1.- ATM

La proteína ATM tiene un papel importante en detectar y señalar las roturas de doble cadena del DNA (DSBs). Su actividad quinasa tiene múltiples dianas: p53, BRCA1, y CHEK2 entre otros.

Los portadores de mutaciones homocigotas o heterocigotas dobles en ATM padecen un desorden recesivo llamado ataxia-telangiectasia (AT), cuya incidencia se estima entre 1:40.000 a 1:100.000. Esta enfermedad se caracteriza entre otros síntomas por inestabilidad cromosómica, mayor sensibilidad a radiación ionizante y mayor susceptibilidad a cáncer, en especial leucemias y linfomas (Hall et al., 2005; Pippard et al., 1988; Thompson et al., 2005; Renwick et al., 2006).

Hasta la fecha hay mucha controversia sobre el papel exacto de las mutaciones germinales en ATM y el riesgo de cáncer de mama. Los diversos estudios realizados no han podido demostrar fehacientemente un aumento del riesgo de cáncer de mama en los portadores de mutación en ATM (Vorechovsky et al., 1996; Fitzgerald et al., 1997; Thompson et al., 2005; Tamimi et al., 2004).

5.2.2.- TGF β 1

La proteína TGF β 1 en la mayoría de tipos celulares normales actúa inhibiendo la proliferación y migración y promoviendo apoptosis (Rosfjord et al., 1999; Janda et al., 2002). Sin embargo, cuando la ruta está alterada, TGF β 1 puede inducir malignización, invasión y angiogénesis (Lehman et al., 2000; Derynck et al., 2001).

Se han descrito varias mutaciones somáticas que interrumpen la ruta de TGF β en tumores de mama (Lucke et al., 2001; Chen et al., 1998; Xie et al., 2002). Por ello, se planteó que las variantes que afectan a la función de los genes de esta ruta estuvieran implicadas en cáncer de mama. Un amplio estudio caso-control mostró que las variantes C509T y Leu10Pro del gen TGF β se asocian de forma recesiva con un aumento de la incidencia de cáncer de mama invasivo (Dunning et al., 2003).

5.2.3.- CASP8

CASP8 pertenece a la familia de las caspasas, que son mediadores importantes del proceso apoptótico. Se ha visto que una variante homocigótica de cambio de aminoácido (R248W) en el gen CASP8 da lugar al síndrome autoinmune linfoproliferativo tipo IIB (Chun et al., 2002).

Por su implicación en la iniciación de la apoptosis se hipotetizó que CASP8 y CASP10 podrían actuar como genes de baja penetrancia de susceptibilidad al cáncer de mama. Sin embargo, el estudio de MacPherson et al. mostró que la variante D302H de CASP8 se asociaba con un menor riesgo de cáncer de mama de una forma dosis-dependiente (MacPherson et al., 2004). El estudio de Frank et al. mostró que la variante V410I también se asociaba de forma estadísticamente significativa con un menor riesgo de cáncer de mama familiar ($p=0.0076$). En los individuos portadores los dos alelos protectores de CASP10 (I410) y CASP8 (H302) el riesgo de cáncer de mama se reducía aún más (Frank et al., 2006).

5.2.4.- CHEK2

CHEK2 es una quinasa del punto de control G2 que juega un papel importante en la reparación de DNA. Su implicación en predisposición al cáncer de mama se sugirió al

encontrarse la mutación truncante 1100delC, que elimina la actividad quinasa, en un individuo con Li-Fraumeni y sin mutaciones en p53.

La frecuencia de la mutación 1100delC en pacientes de cáncer de mama es de 1,5 a 3 veces más alta que en controles (1% aproximadamente). Para los casos de cáncer de mama familiares sin mutación en BRCA1 y BRCA2 la frecuencia ascendía al 4,9-11,4% (Meijers-Heijboer et al., 2002; Vahteristo et al., 2002; Oldenburg et al., 2003). Los análisis de segregación estimaron que 1100delC aumentaba por dos el riesgo en los individuos no portadores de mutación en BRCA1/2 (Meijers-Heijboer et al., 2003; The CHEK2 breast cancer case-control consortium, 2004). También se ha visto que los pacientes portadores de 1100delC desarrollan cáncer de mama antes que los no portadores, y tienen un riesgo 8 veces mayor de cáncer contralateral comparado con los controles (Oldenburg et al., 2003; de Bock et al., 2004; Johnson et al., 2005).

Estos resultados sugieren que 1100delC no es una mutación de alta penetrancia, más bien una variante relativamente común que confiere un riesgo moderado y puede contribuir a las agregaciones familiares de cáncer de mama. Otras variantes de CHEK2 también se han estudiado y podrían aumentar ligeramente el riesgo: I157T podría estar asociada con cáncer de mama, pero el riesgo sería probablemente menor que para 1100delC (Bogdanova et al., 2005; Kilpivaara et al., 2004).

5.3.- EXISTE BRCAx?

Es improbable que si aparecen otros genes tipo BRCA3,4...etc. sean capaces de explicar todas las familias en las que no aparece mutación de BRCA1/2, ya que las frecuencias alélicas de sus mutaciones serían muy bajas. Varios alelos comunes combinados con efectos moderados sí podrían explicarlo. En los últimos años ha surgido la hipótesis de que el conjunto de varios genes modificadores del riesgo pudieran sumar sus efectos y conferir un genotipo de alto riesgo. Es lo que se conoce como “modelo poligénico”. Según este modelo poligénico, la mayor parte de la predisposición heredada al cáncer de mama podría ser debida a muchos genes de riesgo bajo o moderado en combinación con otros factores ambientales y del estilo de vida (Lichtenstein et al., 2000; Antoniou et al., 2003). Las variantes de estos genes son comunes en la población general y, por tanto, el riesgo atribuible

a estos genes podría ser mucho mayor que la proporción de la que dan cuenta BRCA1/2. Se estima que si pudiéramos caracterizar todos los factores de riesgo relevantes en todas las mujeres de una población dada, el 50% de los cánceres de mama surgirían en el 12% de las mujeres con el perfil de riesgo más alto (Pharoah et al., 2002; Balmain et al., 2003).

Actualmente, la identificación de tales genes de baja susceptibilidad es uno de los objetivos de muchos grupos de investigación. Muchos de los genes de baja penetrancia indicados anteriormente son candidatos a este modelo de herencia.

6.- ESPECTRO MUTACIONAL DE BRCA1 Y BRCA2

A pesar de la existencia de otros genes de predisposición, las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son la causa del 40-80% de todos los cánceres de mama y ovario hereditarios. (Claus et al. 1991, Easton et al. 1995 Schubert et al. 1997, Antoniou et al., 2003; Stratton et al., 2008). Los portadores de mutaciones en alguno de estos genes tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama y/o ovario a lo largo de su vida. La detección de estas mutaciones permite la localización de individuos asintomáticos portadores que tienen un riesgo alto de desarrollar un cáncer a lo largo de su vida. Se ha demostrado que la penetrancia de las mutaciones patogénicas de estos genes en España es menor que en el resto de Europa, el riesgo de cáncer de mama hacia los 70 años para los portadores de mutación en BRCA1 es del 52% (C.I.:26-69%) y para BRCA2 es del 47% (C.I.:29-60%). Para el cáncer de ovario el riesgo es del 22% (C.I.:0-40%) y 18% (C.I.:0-35%) respectivamente (Milne et al., 2008). Estas tasas de penetrancia son mucho menores que en otros estudios (Ford et al., 1998; Hopper et al., 1999; King et al., 2003; Marroni et al., 2004) y constituyen una de las razones por las que en España la incidencia de cáncer de mama es menor que en otros países.

La base de datos sobre mutaciones en BRCA1 y BRCA2 más extensa, completa y utilizada como referente a nivel mundial es el “Breast Cancer Information Core” o “BIC” (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). En ella se recogen todas las variantes de ambos genes, tanto las causantes de enfermedad como los cambios neutrales y aquellos de significado desconocido (Szabo et al., 2000). En total hay registradas en el BIC, a julio de 2008, 1643 mutaciones de BRCA1 y 1856 de BRCA2.

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se distribuyen uniformemente a lo largo de todos los exones de ambos genes. La mayor concentración de mutaciones se da en los exones 11 de ambos debido principalmente a su gran tamaño.

6.1.- TIPOS DE MUTACIONES SEGÚN SU EFECTO FISIOPATOLÓGICO

Las técnicas empleadas para el rastreo de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 son inespecíficas, ya que detectan cualquier cambio en la secuencia. Para saber si ese cambio tiene efecto patogénico, tras su detección por técnicas generales de rastreo se procede generalmente a la secuenciación e interpretación del resultado obtenido. Según su efecto sobre la proteína y su función podemos dividir las mutaciones de BRCA1/2 en tres grupos: patogénicas, neutrales o polimorfismos, y variantes de significado desconocido.

6.1.1.- MUTACIONES PATOGENICAS

Estas mutaciones son aquellas que se pueden considerar como causa principal de la alta susceptibilidad al cáncer de mama. La mayoría son alteraciones que dan lugar a una parada prematura en la traducción, lo que genera una proteína más corta (o truncada) y no funcional. Dentro de este tipo de mutaciones encontramos:

- **MUTACIONES DE CAMBIO EN EL MARCO DE LECTURA** (“Frameshift”): Se trata generalmente de pequeñas inserciones o pérdidas de nucleótidos que provocan un desplazamiento del marco de lectura. Al agruparse los tripletes de una forma distinta suele aparecer un codón de parada prematuro que da lugar a la terminación anticipada de la traducción y con ello a una proteína truncada. Esta proteína carece de algunos de los dominios funcionales importantes y su efecto se presupone patológico.
- **MUTACIONES SIN SENTIDO** (“Nonsense”): Se produce un cambio de uno o más nucleótidos que en lugar de codificar para el aminoácido correcto codifican para un codón de parada prematuro y esto da lugar a una proteína truncada.

- **MUTACIONES QUE AFECTAN A LA MADURACIÓN DEL mRNA** (o mutaciones de “splicing”): Son cambios, inserciones o pérdidas de nucleótidos que a menudo conllevan pérdida o amplificación de algún exón y por tanto dan lugar a un transcrito y una proteína anómalos y de efecto patogénico. Este tipo de mutaciones suelen afectar a los sitios críticos de procesamiento situados en las zonas de unión intrón-exón-intrón: existen secuencias nucleotídicas concretas que marcan dónde están las fronteras intrón-exón y exón-intrón a la maquinaria de maduración de forma que los intrones son eliminados correctamente. Además de las secuencias en las fronteras exón-intrón existe una zona rica en pirimidinas hacia el centro del intrón también importante para el proceso. Los cambios en estas tres secuencias consenso pueden afectar al mecanismo de maduración produciendo un transcrito distinto del esperado. Además, una mutación exónica puede crear un nuevo sitio crítico más fuerte que el sitio clásico produciendo una maduración alternativa. Por otro lado, existen secuencias del interior de los exones e intrones que actúan estimulando o reprimiendo la maduración y cambios en las mismas pueden también afectar al “splicing”. En los genes BRCA se han descrito casos de mutaciones exónicas que afectan por esta vía a la maduración (Liu et al., 2001; Fackenthal et al., 2002).

- **MUTACIONES PATOGENICAS DE CAMBIO DE AMINOÁCIDO** (“missense”): Son aquellas que con un simple cambio de aminoácido tienen un efecto patogénico. Su caracterización requiere ensayos que determinen que la funcionalidad o estructura de la proteína se ve gravemente afectada por la mutación, así como estudios poblacionales y de segregación. Este tipo de ensayos son costosos y largos, por lo que no hay muchas mutaciones “missense” claramente clasificadas como patogénicas.

- **GRANDES REORDENAMIENTOS**: Se trata de la pérdida o amplificación de partes grandes de un gen, o incluso de la totalidad del mismo. En los genes BRCA se han descrito algunas de estas reestructuraciones. Los reordenamientos más comunes son aquellos en los cuales desaparecen exones enteros o fragmentos de los mismos, y las que amplifican el gen entero. En caso de que desaparezca un exón completo suele cambiar el marco de lectura y se genera una proteína trunca. En el caso de las

amplificaciones de exones aunque la proteína mantenga su longitud la fase de lectura suele cambiar y aparece una proteína completamente distinta de la germinal. En cualquier caso son proteínas que han perdido su funcionalidad. En la base de datos “Human gene mutation database” o “HGMD” (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), se recogen 48 grandes pérdidas en BRCA1 y 10 en BRCA2 (algunas de exones enteros) y 10 grandes inserciones en BRCA1 y 4 en BRCA2 (HGMD, octubre 2008).

En algunas poblaciones, un número reducido de variantes patogénicas explica un alto porcentaje de las familias con mutación en los genes BRCA. Cuando estas mutaciones recurrentes proceden de un ancestro común y se concentran en grupos poblacionales con características étnicas comunes o con relación histórico-sociológica hablamos de “mutaciones fundadoras”. Poblaciones características con mutaciones fundadoras son la islandesa y los judíos ashkenazi. En España se han descrito dos mutaciones fundadoras: c.330A>G (p.C64X) en BRCA1 originaria de Galicia, y c.9254_9258delATCAT en BRCA2 originaria de Cataluña. La frecuencia de ambas mutaciones sin embargo no es muy alta y da cuenta de un bajo porcentaje de las familias con mutación (Campos et al., 2003).

6.1.2.- MUTACIONES NEUTRALES O POLIMORFISMOS

Las variantes presentes en la población general con una frecuencia mayor del 1%, así como aquellas que en estudios familiares no cosegregan con la enfermedad o se cree que no son la causa fundamental de la aparición del cáncer se definen como variantes neutrales, benignas o polimorfismos. Dentro de este grupo se incluyen tradicionalmente los cambios de nucleótido que no dan lugar a cambio de aminoácido (“mutaciones silenciosas”), mutaciones que aparecen en los intrones, en las zonas 3’ y 5’ no transcritas (zonas UTRs), y alguna mutación de cambio de aminoácido que no repercute en la funcionalidad ni estructura de la proteína.

6.1.3.- MUTACIONES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO (“unclassified variants o UVs”)

Las mutaciones UV son aquellas variantes donde el efecto del cambio de la secuencia sobre la función de la proteína se desconoce. Estas variantes en las regiones codificantes de BRCA1 y BRCA2 pueden estar asociadas o no con un mayor riesgo de cáncer de mama y/o ovario.

Este tipo de mutaciones suelen ser puntuales, de cambio de nucleótido que dan lugar al cambio de un aminoácido de la proteína. En este grupo también encontramos pérdidas e inserciones que no cambian el marco de lectura y mutaciones en los intrones.

El significado funcional de la mayoría de los miles de mutaciones puntuales identificadas hasta la fecha en BRCA1/2 está por determinar. La mayoría de las mutaciones UV son polimorfismos benignos, pero demostrar el significado funcional y clínico de una mutación en particular con certeza es muy difícil. Las consecuencias funcionales de estas variantes se ignoran, lo cual impide en muchas ocasiones obtener un resultado informativo en el test genético.

Las mutaciones UV son un problema común en el diagnóstico genético en general, pero son especialmente problemáticas en BRCA1/2 dado el gran tamaño de estos genes. Entre un 10 y un 15% de los individuos en que se realiza el test genético tendrán una mutación UV en caso de caucásicos, y son aún más frecuentes en las poblaciones de afroamericanos (hasta un 46%) e hispanos (22%) (Frank et al., 2002; Nanda et al., 2005; Weitzel et al., 2005).

Afortunadamente, existen ciertos factores que nos aproximan al significado clínico de una mutación UV. La conjunción de estos factores puede ser de ayuda a la hora de aconsejar a los individuos portadores de estas variantes (Wu et al., 2005; Chenevix-Trench et al., 2006; Karchin et al., 2007).

Entre los factores a estudiar encontramos:

- Determinar si la variante segrega con la enfermedad (con el cáncer de mama y/o ovario) en la familia en estudio y en otras familias portadoras de la misma mutación. Esto requiere la disponibilidad y el consentimiento de varios miembros de la familia para hacerse el test genético, lo cual no siempre es posible. En caso de no poder estudiar a los miembros de la familia hay aproximaciones estadísticas que pueden dar

una idea sobre la segregación (Thompson et al., 2003; Lovelock et al., 2006; Chenevix-Trench et al., 2006).

- Examinar el fenotipo de la familia y de los tumores. Cuando se encuentran casos en edades tempranas en la familia, bilaterales y afectando mama y ovario en el mismo individuo, apunta a que puedan tener una mutación en BRCA1 (Armes et al., 1998; Johansson et al., 1997; Lakhani et al., 1998). Los tumores con mutaciones en BRCA1 suelen ser de tipo medular, con infiltración linfocítica y “triple negativos” (negativos para receptor de estrógenos, de progesterona y ERBB2). Asimismo, los tumores con mutación en BRCA2 suelen aparecer en familias con varones afectados, y suelen ser de tipo ductal invasivo, alto grado, recuento mitótico alto, y receptor de estrógenos positivo (Marcus et al., 1997; Bane et al., 2007).
- Examinar la frecuencia de la variante en población control sana: si la proporción en controles es igual o superior a la de pacientes, la variante probablemente sea un polimorfismo.
- Según diversos estudios, heredar dos copias funcionalmente inactivas de BRCA1/2 da lugar a letalidad embrionaria, por lo que es incompatible con la vida. Por ello, cuando una mutación UV aparece en un alelo de BRCA y una mutación patogénica en el otro (en “trans”), la variante UV probablemente sea un polimorfismo neutral. Asimismo, dos mutaciones patogénicas en el mismo alelo (en “cis”) son muy poco frecuentes.
- La conservación evolutiva entre distintas especies también puede ayudar a dilucidar la cuestión: Los cambios en regiones y residuos altamente conservados entre especies diversas tienen mayor probabilidad de ser patogénicos. De igual forma, cuando el alelo menos frecuente aparece en otras especies probablemente se trate de un polimorfismo.
- Tipo de cambio de aminoácido: si las propiedades químicas de uno y otro son muy diferentes podría afectar a la estructura de la proteína o a su función si reside en el sitio activo de la misma.
- La pérdida de heterocigosidad en tumores de los portadores de una UV, con pérdida del alelo germinal y reteniendo el de la variante, también es un dato a favor de la patogenicidad de la mutación.
- El paso final consiste en realizar ensayos funcionales de pérdida de función de la proteína, en el caso de BRCA1/2, comprobar que retienen la capacidad de mantener la

estabilidad genómica, de modular la reparación de DNA, de controlar el ciclo celular...etc. Estos ensayos son largos y costosos, y aunque den resultados positivos, podrían no reflejar las complicadas funciones de las proteínas “in vivo” y son difíciles de reproducir. Por todo ello, la evidencia funcional no suele estar disponible a la hora de clasificar una mutación UV.

- Recientemente se han desarrollado una serie de aproximaciones matemáticas para determinar el impacto de una mutación UV sobre la estructura y funcionalidad de la proteína. Hay diversos algoritmos de predicción disponibles en la red: POLYPHEN, SIFT, PMUT, SNPS3D...etc. Estos programas se basan en la conservación evolutiva y el tipo de cambio de aminoácido según sus propiedades químicas. También existen algoritmos que predicen si la mutación podría afectar a la maduración del RNA mensajero (ESEfinder...etc.).

Estas aproximaciones dan una idea general, pero nunca pueden sustituir a los ensayos funcionales, epidemiológicos y de segregación.

En resumen, la caracterización de una mutación UV es complicada, ya que en muchos casos la variante aparece en una única familia y los análisis anteriormente descritos no se pueden llevar a cabo. En la práctica clínica, las familias con pocos miembros y los individuos afectados que han fallecido limitan la posibilidad de analizar la cosegregación, y los ensayos de pérdida de heterocigosidad y estudios funcionales no suelen estar disponibles. En este estado de cosas, los modelos que consideran la conservación evolutiva, la frecuencia en controles, la aparición junto a una mutación patogénica...etc., son más fácilmente aplicables.

A pesar de las dificultades, la clasificación de estas variantes UV tiene un gran significado clínico para las familias portadoras de las mismas.

7.- IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO

El rastreo de mutaciones en los genes de alta susceptibilidad al cáncer tiene como objetivo la identificación de individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad, para poder aplicar unos protocolos clínicos específicos. Se justifican los tests genéticos en aquellos casos donde la probabilidad de encontrar una mutación en el individuo es superior al

10% y cuando los resultados de la prueba puedan influir sobre el manejo clínico del paciente o de su familia.

Los individuos con alta probabilidad de ser portadores de mutación en BRCA1 y/o BRCA2 detectados por los criterios de selección deben ser informados en una unidad de consejo genético sobre la prueba, sus implicaciones, los posibles resultados y las consecuencias. Posteriormente, deben tomar la decisión sobre la realización o no del test genético de forma personal y autónoma. Cuando el paciente opta por la realización de la prueba genética debe conocer las posibilidades del resultado.

- **RESULTADO POSITIVO:** Implica la identificación de una mutación patogénica germinal en BRCA1/2. Los individuos con este resultado serán informados sobre las medidas clínicas a las que pueden optar. Además, los familiares pueden ser informados y alentados a realizarse la prueba genética que confirme o descarte la mutación en su DNA ya que los hijos y hermanos tienen un 50% de posibilidades de ser portadores del gen mutado. Cuando el test genético se realiza en los familiares de los probandos portadores de mutación, los resultados pueden dar un “verdadero positivo”, en caso de que el individuo sea portador de la misma mutación patogénica, o “verdadero negativo”, cuando el individuo no ha heredado la mutación y, por tanto, presenta el mismo riesgo de cáncer que la población general.

- **RESULTADO NEGATIVO:** Cuando no se detecta ninguna mutación patogénica en los genes estudiados. Esto no da una respuesta definitiva sobre si el cáncer es o no hereditario. En familias de alto riesgo otros miembros de la familia podrían tener un mayor riesgo que el de la población general, por lo que se establecerán unas pautas de seguimiento. En este caso no se puede ofrecer el diagnóstico a otros familiares. Se asume que el riesgo que presentan es el mismo que el de la población general, pero podrían estar afectados otros genes diferentes a los estudiados.

- **RESULTADO NO INFORMATIVO:** En este caso no aparecen mutaciones patogénicas en el individuo, pero se encuentran variantes de significado desconocido (UVs). Este tipo de mutaciones no se sabe en qué medida afectan a la expresión y/o funcionalidad de la proteína, por lo que el resultado del análisis no es concluyente. De ahí la importancia de caracterizar estas variantes para proporcionar un consejo genético más preciso y veraz a los pacientes.

Cuando un paciente recibe un resultado positivo del análisis genético, existen diferentes opciones clínicas que se pueden seguir: vigilancia periódica, protocolos de quimioprevención y cirugía profiláctica. Es necesario discutir con el paciente todas las alternativas existentes, con sus beneficios e inconvenientes para que tome una decisión sobre el protocolo a seguir.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la población femenina. En España, la incidencia de cáncer de mama es una de las más bajas de Europa, oscila según comunidades entre 40 y 75 casos nuevos por cada 100.000 mujeres (Pollán et al., 2007). En Castilla y León la tasa de incidencia estimada es de 60 casos por cada 100.000 mujeres y representa la segunda causa de mortalidad en nuestra comunidad, con una tasa de 32,8 fallecimientos por cada 100.000 mujeres, según los datos disponibles en el registro de Tumores de Mama y Cervix de la comunidad (“Avances en cáncer de mama”, 2005). La Estrategia regional contra el cáncer en Castilla y León propone, en una de sus líneas estratégicas, el desarrollo de unidades de consejo genético en cáncer y la derivación a éstas de los casos que reúnan los criterios establecidos en el Programa de Consejo genético en Cáncer Hereditario.

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son la causa del 40-80% de todos los cánceres de mama y ovario hereditarios. (Claus et al. 1991, Easton et al. 1995 Schubert et al. 1997, Antoniou et al., 2003; Stratton et al., 2008). Los portadores de mutaciones en alguno de estos genes tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama y/o ovario a lo largo de su vida (Milne et al., 2008). El diagnóstico definitivo de cáncer de mama y ovario hereditario, se establece cuando se detectan mutaciones patogénicas en alguno de estos dos genes.

En base a los datos referidos, y dentro del marco del Programa de Consejo genético en Cáncer Hereditario, nos propusimos la búsqueda de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, en aquellos pacientes y familias de alto riesgo referidas a la unidad de consejo genético del Hospital Universitario de Salamanca durante los años 2003 a 2007. Tras el análisis genético catalogamos las mutaciones encontradas para poder proporcionar información adecuada a las familias que tuvieran una predisposición hereditaria a padecer estos tipos de cáncer, ofreciéndoles la posibilidad de conocer si son o no portadoras de la alteración genética determinante de esa mayor predisposición y valorando las mejores opciones preventivas en cada caso.

Las mutaciones UV son aquellas variantes donde el efecto del cambio de la secuencia sobre la función de la proteína se desconoce. Estas variantes en las regiones codificantes de BRCA1 y BRCA2 pueden estar asociadas o no con un mayor riesgo de cáncer de mama y/o ovario. Entre un 10 y un 15% de los individuos en que se realiza el test genético tendrán una mutación UV en caso de caucasianos (Frank et al., 2002; Nanda et al., 2005; Weitzel et al., 2005), y, dado que las consecuencias funcionales de estas variantes se ignoran, en muchas

ocasiones no es posible obtener un resultado informativo en el test genético. Por ello, la segunda parte de nuestro estudio consistió en intentar clasificar algunas variantes de este tipo localizadas en el gen BRCA2 sirviéndonos de diversos parámetros analizados.

Por lo tanto, los objetivos de nuestro trabajo fueron los siguientes:

1.- Rastreo mutacional de BRCA1 y BRCA2 en pacientes de Castilla y León que cumplan los criterios de selección para familias con cáncer de mama y/o ovario hereditarios, referidas a la unidad de consejo genético del Hospital Universitario de Salamanca durante los años 2003 a 2007.

2.- Clasificación de las mutaciones encontradas en BRCA1 y BRCA2 de acuerdo a su tipo e implicaciones fisiopatológicas según el efecto que provocan.

3.- Estudio pormenorizado de algunas variantes de significado desconocido de BRCA2 y clasificación de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- PACIENTES EN ESTUDIO

Desde diciembre de 2003 hasta diciembre de 2007, se recogieron muestras de sangre periférica a los probandos pertenecientes a 343 familias con alto riesgo de padecer cáncer de mama y/o ovario hereditario.

La selección de las familias de alto riesgo se realizó según los datos de su historia personal y familiar de cáncer en la consulta de consejo genético del servicio de oncología del Hospital Universitario de Salamanca. Los requisitos mínimos que debe reunir un individuo para poder hacerse el estudio de los genes BRCA1 y BRCA2 se resumen en los criterios de selección para el programa de consejo genético en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. Estos criterios se exponen a continuación:

a) CASO ÚNICO DE CÁNCER DE MAMA:

- Existencia de un cáncer de mama bilateral, dos primarios ipsilaterales, o mama y ovario en la misma persona.
- Existencia de un único caso de cáncer de mama u ovario antes de los 40 años.
- Existencia de cáncer de mama en un varón.

a) DOS CASOS DE CÁNCER DE MAMA Y/U OVARIO:

- Existencia de dos casos de cáncer de mama en familiares de primer grado, uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años.
- Existencia de un caso de cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años y de ovario en la misma familia (en familiares de primer o segundo grado).
- Existencia de dos casos de cáncer de ovario diagnosticados a cualquier edad en familiares de primer o segundo grado.

b) TRES O MÁS CASOS DE CÁNCER DE MAMA Y/U OVARIO

- Existencia de tres o más casos de cáncer de mama y/u ovario a cualquier edad, siendo al menos dos de ellos familiares de primer grado.

c) OTROS CASOS

- Según valoración de la unidad de consejo genético, en función de la agregación familiar de cáncer de mama/ovario o de otros tipos de cáncer presentes en la familia.

Se entiende por familiares de primer grado al padre, la madre, hermanos/as e hijos/as. Familiares de segundo grado serían los abuelos, tíos, sobrinos y primos en la misma línea paterna o materna. La historia familiar debe incluir la línea paterna porque nos da información de las mujeres de esa parte de la familia y porque los varones de la familia pueden ser transmisores de las mutaciones y también padecer la enfermedad.

Las muestras de sangre procedente de los pacientes fueron seleccionadas y remitidas por diferentes especialistas desde los hospitales que se indican en la tabla siguiente:

Tabla 1: Hospitales desde donde se recibieron las muestras de pacientes y provincias donde se encuentran.

PROVINCIA	HOSPITAL O CENTRO DE SALUD	SERVICIO
SALAMANCA	Hospital Universitario de Salamanca	Servicio de Oncología Médica, Unidad de consejo genético
LEÓN	Hospital Virgen Blanca	Servicio de Oncología Médica
PONFERRADA	Hospital del Bierzo	Servicio de Oncología Médica
ZAMORA	Hospital Virgen de la Concha	Servicio de Oncología Médica
ÁVILA	Hospital N^a S^a de Sonsoles	Servicio de Oncología Médica

Los pacientes que cumplían alguno de los criterios de selección anteriormente indicados, fueron debidamente informados de la naturaleza y objetivo del estudio y todos firmaron el consentimiento informado para la extracción de una muestra de sangre para realizar el estudio genético.

El estudio de las familias que cumplían los criterios de selección se empezó con el probando que, en todos los casos posibles, había sido diagnosticado de cáncer, y en caso de varios individuos afectos en la misma familia se escogió la paciente diagnosticada de cáncer de ovario, la diagnosticada a edad más precoz, la diagnosticada de cáncer de mama bilateral o el varón diagnosticado de cáncer de mama. Como excepción, se consideró la realización del estudio genético en individuos sanos si todos los familiares afectos habían fallecido, no se podía contactar con ellos o rehusaban hacerse el estudio genético.

2.- CONTROLES

Se analizaron 100 muestras de sangre periférica obtenida de individuos que no habían padecido ningún tipo de cáncer a lo largo de su vida. Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca. Los individuos control presentaban un rango amplio de edades y había 50% de hombres y 50% de mujeres.

3.- EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA genómico de alto peso molecular se extrajo a partir de sangre periférica de los pacientes.

Tras centrifugar la muestra de sangre periférica se aisló la interfase de células leucocitarias, que se resuspendieron en tampón Fornace (0.25M sacarosa; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM KCl; 5mM MgCl₂); EDTA 0.5M pH 8, que es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; proteinasa K 20 mg/L, que degrada las proteínas; y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%, que rompe las membranas celulares. Esta mezcla se incubó a 55° C durante unas 16 horas, tras lo cual se purificó el DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y centrifugando posteriormente para aislar las fases. Con este tratamiento el DNA queda en la fase acuosa, que se limpió de otros residuos mezclándola, de nuevo, con CIAA y centrifugando para separar las dos fases, una que contiene el DNA y otra que contiene los detritos celulares. Tras este paso se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el DNA, que se recuperó, se lavó con etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió en agua desionizada. La muestra de DNA se almacenó en tubos eppendorff a -20° C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como la posible contaminación.

La concentración y el grado de contenido proteico de DNA se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático de DNA/RNA (GeneQuant, Pharmacia), siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de DNA /ml} = (\text{DO } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

(Nota: 50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tiene 50 μg de DNA / ml).

El cociente DO_{260} / DO_{280} se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerándose como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del DNA. Valores superiores indican un exceso de RNA, que se elimina tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente (Sambrook et al., 1989).

4.- AMPLIFICACIÓN DEL DNA

Las muestras de DNA fueron amplificadas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se amplificaron todos los exones codificantes de BRCA1 y BRCA2 así como las fronteras intrón-exón y exón-intrón mediante cebadores específicos que anillaban en la zona intrónica. El exón 11 de cada gen y los exones 10 y 27 de BRCA2, debido a su gran tamaño, fueron amplificados en varios fragmentos ordenados alfabéticamente de 5' a 3'. Al contrario, los exones 5,6,7 y 23,24 de BRCA2 se amplificaron en el mismo fragmento por ser de pequeño tamaño tanto exones como intrones. Los exones 1 de ambos genes y el 4 de BRCA1 no se analizaron por no ser codificantes.

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR multiplex amplificando en cada caso varios exones de cada gen (que se agrupaban en función de las temperaturas de anillamiento). En las tablas siguientes se recogen los diferentes grupos de exones amplificados por PCR para cada gen. En caso de aquellos exones amplificados aisladamente presentan las mismas condiciones de PCRs que los grupos a que corresponden.

Las secuencias de los oligonucleótidos cebadores y el tamaño del fragmento amplificado para BRCA1 se detallan a continuación:

Tabla 2: Secuencia de cebadores para la amplificación de cada exón de BRCA1 y tamaño del fragmento que generan.

BRCA1			
EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	Tamaño del fragmento amplificado
2	5'-GACGTTGTCATTAGTTCTTTGG-3'	5'-GGTCAATTCTGTTCAATTC-3'	315 pb
3	5'-AACGAACCTGAGGCCTTATG-3'	5'-TTGGATTTTCGTCTCACTT-3'	308 pb
5	5'-CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG-3'	5'-ATGGTTTTATAGGAACGCTATG-3'	278 pb
6	5'-CTTATTTTAGTGCCTTAAAAGG-3'	5'-GGTCTTATCACCACGTCATAG-3'	251 pb
7	5'-CACAACAAAGAGCATACATAGGG-3'	5'-AGGAGGACTGCTTCTAGCCTG-3'	350 pb
8	5'-GGTGTCAAGTTCTCTTCAGG-3'	5'-AATCCAGCAATTATTATTAATAC-3'	230 pb
9	5'-GAATATCTGTTTTTCAACAAGTACA-3'	5'-TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA-3'	179 pb
10	5'-GATCTTGGTCATTTGACAGTTC-3'	5'-CCCAAATGGTCTTCAGAATA-3'	240 pb
11A	5'-AGTTGGTTGATTTCCACCTC-3'	5'-AGCCTCATGAGGATCACTGG-3'	739 pb
11B	5'-ATTTGCTCCGTTTTCAAATC-3'	5'-CGGCTAATTGTGCTCACTGT-3'	480 pb
11C	5'-CTGAAGTTAACAAATGCACCTGG-5'	5'-TTCTTTAAGGACCCAGAGTGG-3'	584 pb
11D	5'-TCCAAGTACAGTGAGCACAATTA-3'	5'-AACAAAGTGTGGAAGCAGGG-3'	633 pb
11E	5'-TTTGGCAGTTCAAAAGACTCC-3'	5'-CTCTTGAAGGCTAGGATTGA-3'	620 pb
11F	5'-GCCAAAGTAGCTGATGTATTGG-3'	5'-ATTCATCACTTGACCATTCTGC-3'	423 pb
11G	5'-AGGGGCCAAGAAATTAGAGT-3'	5'-GTGCTCCCAAAAGCATAAA-3'	564 pb
12	5'-GCGTTTTATAGTCTGCTTTACA-3'	5'-TGTCAGCAAACCTAAGAATGT-3'	227 pb
13	5'-AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA-3'	5'-TGTTGGAGCTAGGTCCTTAC-3'	319 pb
14	5'-TTTGTGTATCATAGATTGATGC-3'	5'-AACAAAAGAAGTATCCTAGAGC-3'	387 pb
15	5'-CAGACTTCTAGGCTGTCTTGC-3'	5'-GTGTTTGTCCAAATACAGCAG-3'	378 pb
16	5'-AATTCTTAACAGAGACCAGAAC-3'	5'-AAAACCTTTCCAGAATGTTGT-3'	450 pb
17	5'-AGCTGTGTGCTAGAGGTAACCTC-3'	5'-GTGGTTTTATGCAGCAGATG-3'	190 pb
18	5'-ATCCAGATTGATCTTGGGAG-3'	5'-CTCAGACTCAGCATCAGC-3'	312 pb
19	5'-ATCTCCGTGAAAAAGAGC-3'	5'-CATTGTTAAGGAAAAGTGGAGCA-3'	208 pb
20	5'-ATATGACGTGTCTGCTCCAC-3'	5'-TGCAAAGGGGAGTGAATAC-3'	229 pb
21	5'-AAGCTCTCCTTTTGAAGTC-3'	5'-GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT-3'	298 pb
22	5'-AGTGTAGGGTAGAGGCCTG-3'	5'-AGTCTTGCTCACAGGAGAGA-3'	207 pb
23	5'-CAGAGCAAGACCCTGTCTC-3'	5'-ACTGTGCTACTCAAGCACCA-3'	255 pb
24	5'-ATGAATTGACACTAATCTCTGC-3'	5'-GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA-3'	280 pb

La amplificación por PCR se llevó a cabo agrupando los exones de forma que en cada reacción obtenemos varios fragmentos correspondientes a varios exones (“PCR multiplex”). En la tabla 3 se detallan los grupos de exones, la concentración de cebadores y los reactivos utilizados.

Tabla 3: Grupos de exones amplificados por PCR, temperatura de anillamiento, concentración de cebadores y reactivos utilizados.

	GRUPO	TEMPERATURA ANILLAMIENTO	EXONES	Concentración de cebadores	REACTIVO DE PCR
BRCA1	A	56	2 20 11A 11G	0,32 μ M 0,32 μ M 0,32 μ M 0,32 μ M	MasterMix Eppendorf*
	B	56	11B 11C	0,16 μ M 0,32 μ M	MasterMix Eppendorf*
	C	57	11E 11F	0,24 μ M 0,16 μ M	MasterMix Eppendorf*
	D	54	16 12 5	0,32 μ M 0,32 μ M 0,64 μ M	MasterMix Eppendorf*
	E	54	10 21 22	0,16 μ M 0,16 μ M 0,16 μ M	MasterMix Eppendorf*
	F	54	17 18	0,16 μ M 0,32 μ M	MasterMix Eppendorf*
	G	54	13 15 19	0,16 μ M 0,16 μ M 0,16 μ M	MasterMix Eppendorf*
	H	54	3 6 14	0,16 μ M 0,16 μ M 0,16 μ M	MasterMix Eppendorf*
	I	54	8 9	0,16 μ M 0,16 μ M	MasterMix Eppendorf*
	J	56	23 24	0,64 μ M 0,32 μ M	MasterMix Eppendorf*
	Exones de BRCA1 que se amplifican por separado	57	11D	0,32 μ M	MasterMix Eppendorf*
		62	7	0,8 μ M	MasterMix Eppendorf*

* Con el reactivo mastermix de Eppendorf se prepara un volumen de reacción total de 25 μ l, donde tendremos una concentración final de mastermix de 1x, de magnesio 1,5mM, dNTPs 200 μ M, 1,25 unidades de Taq polimerasa, unos 100-200 ng de DNA genómico y la concentración que corresponda de cada pareja de cebadores.

En la tabla 4 se describen los programas de amplificación utilizados para BRCA1.

Tabla 4: Programas de amplificación para BRCA1

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
95° C	10'	X40 ciclos	95°C	10'	X40 ciclos	95°C	10'	X40 ciclos
94°C	1'		94°C	1'		94°C	1'	
56°C	1		57°C	1		54°C	1	
72°C	2'		72°C	2'		72°C	2'	
72°C	10'		72°C	10'		72°C	10'	
Programa para los grupos A, B, J			Programa para los grupos C y exón 11D			Programa para los grupos D,E,F,G,H,I		

El exón 7 de BRCA1 tiene la particularidad de presentar en su extremo 3' en la región intrónica adyacente al exón una secuencia corta repetitiva (STR), que imposibilita su análisis por las técnicas habituales (CSGE,dHPLC...), por lo que se procede directamente a su secuenciación en todos los casos. Tiene un programa de PCR distinto al resto:

Tabla 5: Programa de amplificación del exón 7 de BRCA1

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	2'	X 35 ciclos
94° C	45''	
62° C	45''	
72° C	1'	
72° C	5'	

La secuencia de los oligonucleótidos cebadores y los tamaños de los fragmentos amplificados para BRCA2 se detalla en la tabla 6:

Tabla 6: Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de BRCA2 y tamaño del fragmento que generan.

BRCA2			
EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	Tamaño del fragmento amplificado
2	5'-CTCAGTCACATAATAAGGAAT-3'	5'-ACACTCTGACGTACTGGGTTT-3'	256 pb
3	5'-TCTGGGTCACAAATTTGTCTGTCA-3'	5'-TTCCTAGTTTGTAGTTCTCCCCAGTC-3'	356 pb
4	5'-AGAATGCAAAATTTATAATCCAGAGTA-3'	5'-AATCAGATTCATCTTTATAGAACAAA-3'	249 pb
5,6,7	5'-AACAATTTATATGAATGAGAATC-3'	5'-AACAGAAGTATTAGAGATGAC-3'	686 pb
8	5'-AATAGTAGATGTGCTTTTTGA-3'	5'-ACATATAGGACCAGGTTTAGAGAC-3'	285 pb
9	5'-CTAGTGATTTTAACTATAATTTTTG-3'	5'-GTTCAACTAAACAGAGGACT-3'	164 pb
10A	5'-TATAAAATATTAATGTGCTTCTGT-3'	5'-AAAGGGCTTCTGATTTGCTAC-3'	374 pb
10BD	5'-ATCTGAAGTGAACCAAAATGATAC-3'	5'-GTGGATATTAACCTGCATTCTTCAA-3'	681 pb
10E	5'-TATGTCCAAATTTAATTGATAAT-3'	5'-AAACACAGAAGGAATCGTCATC-3'	320 pb
11AB	5'-GATGGTACTTTAATTTTGTCACTTTG-3'	5'-TTTCATGATCATATAAAAAGAC-3'	425 pb
11C	5'-CAAAAGTGAATACAGTGATAC-3'	5'-ATAATTTTCATTTAAAGCACATACAT-3'	254 pb
11D	5'-TCTAGAGGCAAAGAATCATA-3'	5'-TCATTGTCTGAGAAAAGTTC-3'	305 pb
11EF	5'-TTCAAAAATAACTGTCAATCC-3'	5'-CTGAAGCTACCTCCAAAAGTGTG-3'	430 pb
11GH	5'-ACAAATGGGCAGGACTCTTAGG-3'	5'-GCTGCTGTCTACCTGACCAA-3'	566 pb
11IL	5'-GATGCTGATCTTCATGTCATAA-3'	5'-AAAAAGTTAAATCTGACAAATCT-3'	688 pb
11MO	5'-TTTATGAAGGAGGGAAACACTCA-3'	5'-CATTGATGGCTAAAAGTGGTG-3'	575 pb
11PQ	5'-TCATACAGTAGCGGGAAAAA-3'	5'-AATGACTGAATAAGGGGACTGAT-3'	421 pb
11R	5'-GTCCTGCAACTTGTACAC-3'	5'-GATTTTGTCAATTTTCAGC-3'	243 pb
11ST	5'-AACCAGAAAAGATAAATACT-3'	5'-ATTTTTGATTTATTCTCGTTGTT-3'	550 pb
11UV	5'-AAGACATATTTACAGACAGT-3'	5'-TTGGGATATTAATGTTCTGGAGTA-3'	539 pb
11WX	5'-AAAGTAACGAACATTCAGACCA-3'	5'-GTGAGACTTTGGTTCCTAAT-3'	468 pb
11YZ	5'-TTCAACAAGACAAACAACAGT-3'	5'-AGCATACCAAGTCTACTGAATAAAC-3'	443 pb
12	5'-AGGTCACTATTTGTGTGTAAG-3'	5'-AGTGGCTCATGTCTGTAAT-3'	358 pb
13	5'-TAAAGCCTATAATTGTCTCA-3'	5'-CTTCTTAACGTTAGTGTCAAT-3'	271 pb
14	5'-ATGTAGCAAATGAGGGTCTG-3'	5'-CAAAGGGGAAAAACCATCAG-3'	609 pb
15	5'-GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT-3'	5'-AGGATACTAGTTAATGAAATA-3'	314 pb
16	5'-TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTT-3'	5'-AACACACAATCTTTTGCATAGA-3'	330 pb
17	5'-CAGAGAATAGTTGTAGTTGTTGAA-3'	5'-AGAAACCTTAACCCATACTGC-3'	306 pb
18	5'-ATTCAGTTTTTATTCTCAGTTATT-3'	5'-TTTAACTGAATCAATGACTG-3'	500pb
19	5'-AAGTGAATATTTTAAAGGCAGTT-3'	5'-TATATGGTAAGTTTCAAGAAT-3'	249 pb
20	5'-CACTGTGCCTGGCCTGATAC-3'	5'-ATGTTAAATTCAAAGTCTCTA-3'	296 pb
21	5'-GGGTGTTTTATGCTTGGTTCT-3'	5'-CATTTCACATATTCCTTCTG-3'	304 pb
22	5'-TTTTGTTCTGATTGCTTTTATT-3'	5'-AATCATTTTGTAGTAAGGTCAT-3'	314 pb
23-24	5'-ACTTCTCCATTGCATCTTTCTCA-3'	5'-AGCTCCAATAATCATAAGA-3'	520 pb
25	5'-TAAAATTCATCTAACACATCTAT-3'	5'-ATTTCCCATTCCCCATCT-3'	450 pb
26	5'-AAGGAAATACTTTTGGAAACATAA-3'	5'-TTTACTAGGTATACAACAGAA-3'	299 pb
27A	5'-TAGGAGTTAGGGGAGGGAGACTGTGT-3'	5'-TTTTTAAATGGAGTCATCTGAGGAGA-3'	462 pb
27B	5'-AAGGCATTTTCAGCCACCAAGGAGT-3'	5'-GTGGTTTGAAATTATATCCAGTCT-3'	450 pb

La amplificación por PCR también se llevó a cabo agrupando los exones de forma que en cada reacción obtenemos varios fragmentos correspondientes a varios exones (“PCR multiplex”). En la tabla 7 se detallan los grupos de exones, la concentración de cebadores y los reactivos utilizados.

Tabla 7: Grupos de exones amplificados por PCR, temperatura de anillamiento, concentración de cebadores y reactivos utilizados.

	GRUPO	TEMPERATURA ANILLAMIENTO	EXONES	Concentración de cebadores	REACTIVO PCR
BRCA2	A	60-50	3 23-24	0,16µM 0,16 µM	Taq Roche*
	C	60-50	12 14 27B	0,32 µM 0,64 µM 0,48 µM	Taq Roche*
	D	52	9 13 19	0,32 µM 0,32 µM 0,32 µM	Taq Roche*
	E	60-50	21 11EF 11MO	0,32 µM 0,16 µM 0,32 µM	Taq Roche*
	F	52	5-6-7 16	0,32 µM 0,24 µM	Taq Roche*
	G	60-50	2 17	0,16 µM 0,32 µM	Taq Roche*
	H	60-50	4 22 25	0,32 µM 0,32 µM 0,32 µM	Taq Roche*
	I	52	11AB 11D	0,48 µM 0,16 µM	Mastermix Eppendorf***
	J	60-50	11C 11GH 11IL	0,32 µM 0,24 µM 0,64 µM	Taq Roche*
	K	60-50	10A 10E	0,24 µM 0,16 µM	Taq Roche*
	L	60-50	10BD 11UV 11YZ	0,32 µM 0,32 µM µM 0,32 µM	Taq Roche*
	LL	60-50	11PQ 11R 11WX	0,32 µM 0,32 µM µM 0,32 µM	Taq Roche*
	EXONES DE BRCA2 QUE SE AMPLIFICAN POR SEPARADO	60-50	8	0,16 µM	TaqGold Applied **
		50	11ST	0,64 µM	Taq Roche*
		50	15	0,8 µM	Mastermix Eppendorf***
60-50		18	0,8 µM	Mastermix Eppendorf***	
50		20	0,48 µM	Mastermix Eppendorf***	
52		26	0,16 µM	Mastermix Eppendorf***	
	60-50	27A	0,16 µM	Taq Roche*	

* Con el reactivo de PCR de Roche preparamos siempre un volumen de reacción de 25 µl, donde tendremos 2,5 unidades de Taq polimerasa, 2,5 mM de dNTPs, la concentración del tampón con magnesio (tampón 10X con 15 mM de MgCl₂) varía para cada grupo: al 0,8X (grupo LL), al 1X (grupos A,H,J,F y exón 27a), al 1,2X (grupo K,L, exón 11ST), al 1,4X (grupo G), al 1,5X (C,D,E) y la concentración necesaria de cada cebador.

** Con el reactivo TaqGold de Appliedbiosystems utilizamos un volumen de reacción de 25 µl donde tendremos 2,5 unidades de TaqGold, 2,5 mM de dNTPs, tampón al 0,88X, 2,4 mM de MgCl₂, y 0,16 µM de cebadores del exón 8.

*** Utilizamos el reactivo mastermix de eppendorf con las mismas condiciones que para BRCA1.

Para BRCA2 se utilizaron también tres programas de amplificación distintos, que se detallan en la tabla 8.

Tabla 8: Programas de amplificación para BRCA2.

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
95° C	2'		95°C	2'		94°C	5'	
94°C	45''	X30 ciclos	94°C	45'	X35 ciclos	94°C	30''	X30 ciclos
60°C*	1'		52°C	1'		50°C	30''	
72°C	1'		72°C	1'		72°C	1'	
72°C	3'		72°C	5'		72°C	7'	
Programa para los grupos A,C,E,G,H,J,K,L,LL y los exones 8 y 27A			Programa para los grupos D, F, I y los exones 18 y 26			Programa para los exones 11S, 15 y 20		
* la temperatura de anillamiento desciende 0,3° C por ciclo hasta los 50° C.								

Un alícuota de los fragmentos amplificados mediante PCR se separaron por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% (Gibco-BRL) preparados con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM pH=8.3). Para monitorizar la migración del DNA en el gel se utilizaron dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga añadido a la muestra: el xilenocianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 Kb. Nos servimos de un marcador de peso molecular comercial que corría en paralelo a las muestras para inferir el tamaño de los fragmentos: el DNA del fago Φ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII (Promega) fue el marcador utilizado rutinariamente.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando bromuro de etidio (0.1 μ g/ml), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254nm). Los resultados obtenidos se conservaron mediante un sistema de fotografía digital (BioRad).

5.- PCR “EXTENDED”.

Para amplificar los fragmentos de DNA genómico de un tamaño superior a 3 Kb se llevó a cabo una PCR “extended”. Se empleó el reactivo “Expand High Fidelity PCR System” (Roche). Contiene una mezcla de enzimas polimerasas: la Taq polimerasa y una Tgo polimerasa “proofreading”, es decir, con actividad 3’→5’ exonucleasa, que le confiere una tasa de fidelidad en la síntesis de DNA tres veces mayor que una Taq polimerasa convencional. Para llevar a cabo la reacción de PCR se prepararon 2 mezclas iniciales. El “mix 1” contiene 18µl de ddH₂O, 1 µl de la mezcla de dNTPs(200 µM cada dNTP), 2µl de cada cebador sentido y antisentido y 2 µl de DNA de la muestra a estudiar, para un volumen final de 25 µl. La concentración de DNA debe tener unos valores entre 10 y 250 ng. El “mix 2” contiene 19,25µl de ddH₂O, 5 µl de Expandhighfidelity buffer 10x (con 1.5 ml de MgCl₂) y 0.75 µl del mix de enzima proporcionado por el reactivo, para un volumen final de 25 µl. Ambas mezclas se realizan en hielo. Se colocaron en el mismo tubo de PCR y se homogeneizaron mediante vortex y centrifugación posterior. La mezcla final de reacción se somete al programa de PCR que corresponda.

Esta técnica se utilizó para confirmar en DNA genómico la pérdida del exón 14 detectada mediante MLPA (“PCR multiplex dependiente de ligación”) en el paciente 5290. Para ello se utilizaron un par de cebadores situados uno en el intrón 12 (sentido) y otro en el intrón 15 (antisentido). La secuencia de los cebadores y el programa de amplificación utilizado se detallan a continuación:

Tabla 9: Condiciones de PCR “extended” para la confirmación de la pérdida del exón 14 de BRCA1

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Cebadores utilizados
94° C	2’	1	Cebador sentido 13F (localizado en intrón 12): 5’-AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA-3’
94° C	15’’	X 10 ciclos	
54° C	30’’		
68° C	4’		
94° C	15’’	X20 ciclos	Cebador antisentido 15R (localizado en intrón 15): 5’-GTGTTTGTCCAATACAGCAG-3’
54° C	30’’		
72° C	8’ *		
72° C	7’		
*con un incremento de 5’’ por ciclo			

El fragmento de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La secuenciación del mismo se llevó a cabo con los cebadores con los que se realizó la PCR, pero dado el gran tamaño del fragmento se hizo necesario el diseño de nuevos oligonucleótidos para completar la secuenciación del mismo. En la tabla 10 se recoge la secuencia de estos nuevos cebadores.

Tabla 10: Cebadores utilizados para secuenciar el producto de PCR “extended” del exón 13 al 15.

Nombre	Localización	Secuencia
Int13F(cebador sentido)	Intrón 13	5'-GAACAACACAGAAAGCCTAA-3'
Int13F2 (cebador sentido)	Intrón 13	5'-TATCTGTGTAAATCTACTAT-3'
Int14R (cebador antisentido)	Intrón 14	5'-CAGAGCAAGACTCTGTCAAG-3'
Int14R4 (cebador antisentido)	Intrón 14	5'-ATGTTTTCTGGCTTTGGGAG-3'

6.- EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR

Para la extracción del RNA partimos de 1,5 ml de sangre periférica. Y utilizamos el reactivo “QIAamp RNA blood Mini Kit” de Qiagen siguiendo las especificaciones del fabricante. Este reactivo permite eliminar los hematíes y recuperar los leucocitos por centrifugación, lisanlos utilizando condiciones altamente desnaturalizantes que inactivan las RNAasas y recoger el RNA mediante su unión a una membrana de silica, tras lo cual, se separa de la membrana y eluye en agua DEPC para su uso posterior.

En concreto, se mezcló un volumen de sangre con 5 volúmenes de tampón EL. Esta mezcla se incubó 10-15 minutos en hielo y se mezcló dos veces con “vortex” durante la incubación. Con este tratamiento se lisan los eritrocitos. Después, se centrifugó 10 minutos a 4° C y 400g, se descartó el sobrenadante y se recogió el precipitado que es donde están los leucocitos. Mezclamos el precipitado con dos volúmenes del tampón hipotónico “EL” (“erythrocyte lysis buffer”) por cada volumen de sangre del que habíamos partido y resuspendimos con “vortex”. De esta forma lisamos los eritrocitos. Centrifugamos 10 minutos a 4° C y 400g y eliminamos el sobrenadante.

Añadimos 600 µl de tampón de lisis (que consta de β-mercaptoetanol y tampón “RLT” o “lysis buffer” en relación 1:100) al sedimento de leucocitos y lo resuspendimos. Este tampón lisa los leucocitos. Pipeteamos el lisado en una columna de centrifugación

“QIAshredder” sobre un tubo de recolección de 2 ml y centrifugamos 2 minutos a máxima velocidad para homogeneizarlo. Tras esto, descartamos la columna y nos quedamos con el lisado homogeneizado. Le añadimos un volumen de etanol al 70%, mezclamos pipeteando y lo pasamos a una nueva columna de centrifugación “QIAamp” sobre un tubo recolector. Centrifugamos 15 segundos a 10.000 rpm. Tras esto, transferimos la columna a un nuevo tubo recolector y añadimos 700 µl de tampón “RW1”. Centrifugamos 15 segundos a 10.000 rpm. Pasamos la columna a un nuevo tubo recolector y añadimos 500 µl de tampón “RPE”. Centrifugamos 15 segundos a 10.000 rpm. Añadimos 500 µl de tampón “RPE” y centrifugamos a 14000 rpm durante 3 minutos. Transferimos la columna a un nuevo tubo recolector y centrifugamos durante 1 minuto para eliminar los restos de tampón “RPE”. Por último, pasamos la columna a un tubo de 1,5ml limpio y añadimos de 30-50 µl de agua libre de RNAsas. Centrifugamos un minuto a 10.000 rpm para eluir el RNA. Guardamos el RNA obtenido a -20° C para su conservación.

Para la transcripción inversa del RNA (RT-PCR) se utilizó el reactivo “ImProm II Reverse Transcription System” (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para ello primero, se desnaturalizó mediante calor una mezcla de 1 µg de RNA total y 0,5 µg de oligo(dT)15 minutos a 70° C durante 5 minutos. Después, la mezcla fue enfriada en hielo durante 5 minutos. A la mezcla anterior se añadieron 15 µl de otra mezcla que contenía: 1 µl de transcriptasa inversa ImProm-II, 4 µl de tampón ImPromII 5X, 1,2-6,4 µl de MgCl₂ (obteniendo una concentración final de 1,5-8 mM), 1 µl de la mezcla de dNTPs 10mM (concentración final 0,5 mM), 20 unidades de inhibidor de ribonucleasas RNAsin y agua libre de RNAsas hasta 15 µl. La mezcla final de reacción se sometió a un programa de amplificación con las fases siguientes:

- 25° C durante 5 minutos, lo que permite el anillamiento del cebador con el RNA molde.
- 42 ° C durante 1 hora, temperatura a la cual se produce la elongación que permite la síntesis del DNA complementario (cDNA) mediante la transcriptasa inversa.
- 70° C durante 15 minutos, temperatura de desactivación de la enzima, ya que debe estar inactivada antes de proceder a la posterior amplificación por PCR del cDNA.

Para comprobar que la síntesis de cDNA se ha realizado con éxito, se amplificó mediante PCR parte del cDNA correspondiente al gen de la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), que se expresa constitutivamente en todos los tejidos del organismo, cuya amplificación debe dar lugar a un fragmento de 538 pb visible en una electroforesis en gel de agarosa. Para esta PCR se utilizó el reactivo mastermix de Promega. Con este reactivo preparamos un volumen de reacción de 25 µl donde tendremos mastermix 1X (0,625 unidades de Taq polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 5 mM de MgCl₂, los cebadores sentido y antisentido al 20 µM cada uno, unos 100 ng de cDNA y 8,5 µl de agua desionizada libre de nucleasas. La secuencia de los cebadores utilizados y el programa de amplificación se detallan a continuación:

Tabla 11: Condiciones de amplificación del gen GAPDH en cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Cebadores utilizados
94° C	5'	X 35 ciclos	Cebador sentido (localizado en exón 4)
94° C	30''		5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'
55° C	30''		Cebador antisentido (localizado en exón 8)
72° C	30''		5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
72° C	10'		

Esta técnica fue la utilizada para obtener el cDNA del paciente 5290 y confirmar la pérdida del exón 14 de BRCA1 detectada mediante MLPA (ver sección “Resultados”). Se obtuvo el cDNA del paciente con la mutación a partir de su RNA mediante la técnica anteriormente descrita y se procedió a la amplificación mediante PCR del fragmento que comprende los exones 13,14 y 15 de BRCA1. Para ello nos servimos de cebadores situados en los exones 13 y 15 del gen. Para la reacción de PCR se utilizó el reactivo mastermix de Promega en un volumen final de 25 µl: 12.5µl de mastermix 2X (0,625 unidades de Taq polimerasa, y una concentración final de 200 µM de cada dNTP y 5 mM de MgCl₂), 20 mM de cada cebador, 7,5 µl de agua desionizada libre de nucleasas y 2 µl de la dilución de cDNA (aproximadamente 100 ng). Se realizó en paralelo la amplificación de una muestra control y de la muestra del paciente con la pérdida del exón 14 para comparar la diferencia de tamaño de los fragmentos obtenidos. Los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, se aislaron del gel y fueron purificados con el reactivo “High Pure Product Purification Kit” (Roche) según las especificaciones del fabricante. El resultado

se confirmó mediante secuenciación automática empleando los cebadores utilizados para la reacción de PCR.

La secuencia de los cebadores y el programa de amplificación se detallan a continuación:

Tabla 12: Condiciones de amplificación de cDNA para confirmar la pérdida del exón 14 de BRCA1

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Cebadores utilizados
95°C	10'	X 35 ciclos	Cebador sentido (localizado en exón 13): 5'-CAGGAAATGGCTGAACTAGA-3'
94°C	1'		
56°C	1'		Cebador antisentido (localizado en exón 15): 5'-AAGTAAGATGTTTCCGTCAA-3'
72°C	2'		
72°C	10'		

Esta técnica también se utilizó para comprobar una mutación patogénica de nueva descripción que afecta al procesamiento del RNA: **IVS23+3A>C** de BRCA1. Amplificamos el cDNA mediante cebadores situados en el exón 22 y 24 de BRCA1. Se hizo en paralelo la amplificación de una muestra control y de la muestra del paciente con la mutación para comparar la posible diferencia de tamaño de los fragmentos obtenidos. Para la amplificación mediante PCR se utilizó el reactivo mastermix de promega en un volumen final de 25 µL: 12,5 µL de Master Mix(0,625 unidades de Taq polimerasa, y una concentración final de 200 µM de cada dNTP, y 5 mM de MgCl₂); 8,5 µL de agua libre de nucleasas; 1µL de cada oligonuclótido cebador (20 mM) y 2 µL de cDNA (100-200ng). La secuencia de los cebadores y el programa de amplificación se detallan en la tabla 13.

Tabla 13: Condiciones de amplificación de cDNA para confirmar la mutación IVS23+3A>C de BRCA1

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Cebadores utilizados
95° C	5'	X30 ciclos	Cebador sentido (localizado en el exón 20) C19F: 5' GTGACCCAGTCTATTAAAGA 3'
95° C	30''		
55° C	30''		Cebador antisentido (localizado en el exón 24) R4: 5' CAGTAGTGGCTGTGGGGGAT 3'
72° C	30''		
72° C	10'		

Los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, se aislaron y purificaron del gel empleando el reactivo “High Pure Product Purification Kit” (Roche) y el resultado se confirmó mediante secuenciación automática.

También mediante RT-PCR se comprobó la maduración del RNA en dos pacientes que portaban dos variantes sin clasificar: H150R y I2840V respectivamente.

La variante H150R se localiza en el exón 5 de BRCA2, por lo que se diseñaron cebadores en el exón 3 y 7 para amplificar esa región en el cDNA sintetizado a partir del RNA del paciente. La variante I2840V se localiza en el exón 20 de BRCA2, por lo que en este caso utilizamos para la amplificación cebadores localizados en el exón 17 y en el 21. La amplificación en ambos casos se llevó a cabo mediante PCR y se utilizó el reactivo mastermix de promega en un volumen final de 25 µL: 12,5 µL de Master Mix(0,625 unidades de Taq polimerasa, y una concentración final de 200 µM de cada dNTP, y 5 mM de MgCl₂); 8,5 µL de agua libre de nucleasas; 1µL de cada oligonuclótido cebador (20 mM) y 2 µL de cDNA (100-200ng).

La secuencia de los cebadores y el programa de amplificación para cada variante se resumen en la tabla 14.

Tabla 14: Condiciones de amplificación de cDNA para comprobar la maduración del RNA cuando están presentes las variantes H150R o I2840V. El programa de amplificación fue el mismo en ambos casos.

Programa de amplificación			Cebadores utilizados para la amplificación de los exones 3 al 7 de BRCA2 en cDNA
Temperatura	Tiempo	Ciclos	Cebador antisentido (localizado en el exón 7) R5S: 5' GCACAGTAGAACTAAGGGTGG 3'
95° C	5'	X40 ciclos	
95° C	1'		
55° C	1'		
72° C	1'		
72° C	7'		Cebadores utilizados para la amplificación de los exones 17 al 21 de BRCA2 en cDNA
			Cebador sentido (localizado en el exón 17) 17F: 5' ACTCCAGGTGTGGATCCAAA 3'
			Cebador antisentido (localizado en el exón 21) R20S1: 5' CTCTGCACCATCTTGCAA 3'

7.- ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR MEDIANTE CSGE (ELECTROFORESIS EN GEL SENSIBLE A LA CONFORMACIÓN).

Los fragmentos de DNA amplificados fueron sometidos a análisis por CSGE siguiendo la técnica descrita por Orita, con algunas modificaciones (Orita et al., 1989). El gel fue teñido con nitrato de plata.

El paso inicial del análisis por CSGE consiste en desnaturalizar el producto de PCR a 95° C y volver a renaturalizarlo, para permitir la formación de heterodúplex (apareamiento entre cadenas que difieren en su secuencia) en el caso de individuos heterocigotos. Heterodúplex y homodúplex migran de manera diferencial en geles de acrilamida.

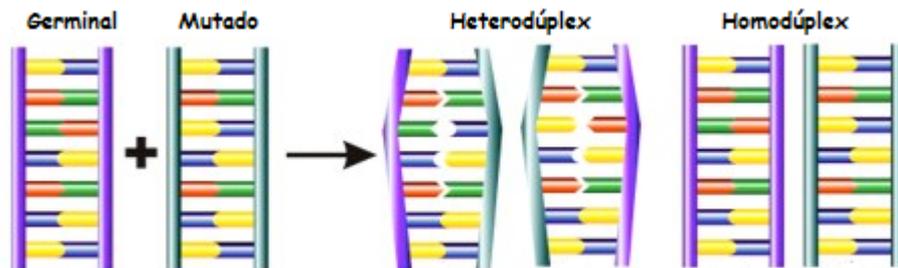


Figura 12: Reanillamiento de las hebras de DNA tras la desnaturalización lenta y formación de heterodúplex.

Los geles para electroforesis fueron hechos con MDETM 2X (AT Biochem, Inc. USA), que es un polímero de acrilamida modificado derivado del vinilo. Se utilizaron las siguientes cantidades para preparar cada gel: agua desionizada 7.705 mL, formamida 99% 5.98 mL, etilenglicol 99% 4.025 mL, TBE 10X 2.415 mL, MDETM 2X 20.125 mL, TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina) 36.8 µL, APS (persulfato de amonio) 25% 138 µL para un volumen final de 40.25 mL. La electroforesis se llevó a cabo a 180 voltios durante aproximadamente 21 horas (el tiempo varió dependiendo del tamaño del fragmento de PCR a analizar). En paralelo se realizó, en todos los casos, la electroforesis de un fragmento de PCR sin mutación.

Para la tinción de plata se utilizó el reactivo comercial DNA Silver Staining Reactivo de (G.E. healthcare), siguiendo las instrucciones del comerciante.

Los fragmentos de PCR de un mismo exón de distintos pacientes, con distintos patrones de migración en el gel de acrilamida, fueron posteriormente secuenciados.

Esta técnica fue la utilizada rutinariamente para rastreo de mutaciones en BRCA1 y BRCA2.

8.- DISCRIMINACION ALELICA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO DESNATURALIZANTE (dHPLC).

Se utilizo el sistema WAVE® (Transgenomic, Gran Bretaña), basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico en fase de reversa (Xiao and Oefner, 2001). Consiste en una columna llena de una matriz no porosa de bolas de polímeros de poliestireno-divinilbenceno (fase estacionaria). Estas bolas están unidas a cadenas de 18 carbonos (C-18) que forman puentes C-C. Por su naturaleza, las bolas de la columna son electrostáticamente neutras e hidrofóbicas, por lo que no reaccionan con los ácidos nucleicos. Para facilitar esta unión, se añade acetato de trietilamonio (TEAA), que actúa como molécula puente que ayuda a la adsorción de los ácidos nucleicos a las bolas, ya que es hidrofóbica (por lo que se une a la matriz) y tiene carga positiva (por lo que se une a los ácidos nucleicos). Para poder realizar el análisis, debe permitirse la formación de los homodúplex y heterodúplex mediante desnaturalización de las muestras a 95° C y renaturalización de las mismas. La resolución de las muestras se realiza aplicando una temperatura de desnaturalización específica para cada fragmento, que depende de la longitud y de la secuencia de bases del fragmento que se quiere amplificar.

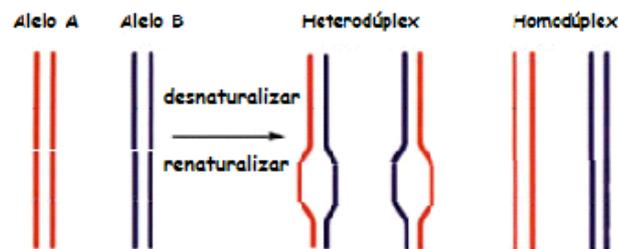


Figura 13 : Reanillamiento tras la desnaturalización progresiva de los productos de PCR

La fase móvil del sistema consiste en una combinación de soluciones que extraen el DNA de la columna: TEAA 0.1M y acetonitrilo al 25%. A concentraciones mayores de acetonitrilo, la interacción hidrofóbica entre la matriz y el DNA/TEAA se va debilitando y los fragmentos comienzan a eluirse de la columna, en primer lugar los heterodúplex (que

presentan una unión más débil) y posteriormente los homodúplex (que quedan retenidos con más fuerza y, por tanto, son los últimos en salir de la columna).

Los fragmentos de DNA eluidos pasan por un detector ultravioleta a medida que van saliendo de la columna, y el software de análisis (*Navigator*, Sistema WAVE, Transgenomic) lo representa en forma de picos, correspondientes al tiempo que tarda cada fragmento en eluirse de la columna, llamado también tiempo de retención.

Esta técnica fue utilizada para la detección del polimorfismo A10204T (K3326X) del exón 27B de BRCA2, para lo cual se utilizó una temperatura de desnaturalización de 55,5° C, y un 57,9% de tampón B. También la utilizamos para confirmar mutaciones detectadas por CSGE en el exón 11E de BRCA1, para lo cual utilizamos una temperatura de desnaturalización de 54,4° C y un 59,8% de tampón B (figura 14).

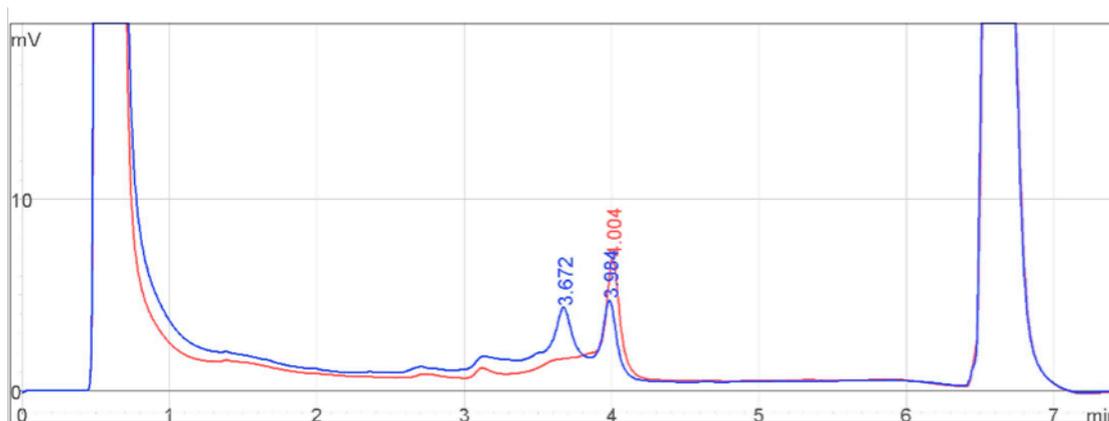


Figura 14: La línea azul corresponde a una muestra heterocigota para la mutación A10204T, y la línea roja un homocigoto germinal 10204AA. En el eje X aparece el tiempo de retención en la columna.

9.- DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN:

Detectamos las mutaciones C6328T y G8377T de BRCA2 mediante nucleasas de restricción.

Para detectar la mutación C6328T en primer lugar amplificamos mediante PCR el exón 11WX, que contiene el nucleótido 6328. El fragmento resultante tiene una longitud de

468 pb. Utilizamos la enzima Eco105I (Fermentas), la cual es un isoesquizómero de SnaBI, que reconoce la secuencia:



Mezclamos 3 μl del producto de PCR correspondiente a cada individuo con 0,6 unidades de enzima (1 μl), 2 μl de tampón Tango 10X y 4 μl de agua desionizada. Incubamos esta mezcla en un baño a 37° C durante 3-4 horas. Posteriormente, los productos de digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio y visualización en una lámpara de luz ultravioleta. Según el genotipo de los individuos, obtuvimos tres patrones distintos:

- Genotipo 6328CC: La enzima reconoce la secuencia en ambos alelos, generando fragmentos de 417 pb y 51 pb.
- Genotipo 6328CT: La enzima reconoce el alelo C y corta, pero no el T, por lo que se generan fragmentos de 468 pb, 417 pb y 51 pb. El fragmento de 51 pb no es visible en geles al 2%, pero los otros dos sí, lo que permite distinguir los genotipos.
- Genotipo 6328TT: En el homocigoto TT la enzima no reconoce la secuencia y no corta. Obtenemos un fragmento único de 468 pb.

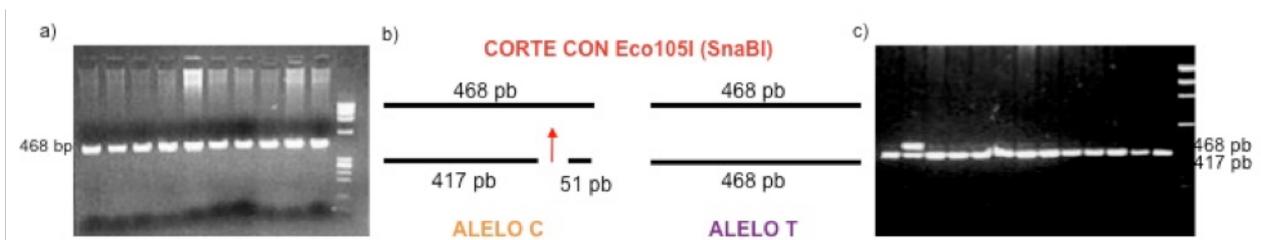


Figura 15: a) Fragmentos de PCR del exón 11w, b) Patrón de corte de Eco105I, c) Fragmentos obtenidos en la digestión: todos los carriles son homocigotos CC salvo el segundo que es heterocigoto CT

Para detectar la mutación G8377T, amplificamos mediante PCR el exón 18 de BRCA2, que contiene el nucleótido 8377.

El fragmento amplificado tenía una longitud de 500 pb. Utilizamos la enzima CfrI (Fermentas), isoesquizómero de EaeI, que reconoce la secuencia:



Mezclamos 5µl del producto de PCR correspondiente a cada individuo con 0,5 unidades (0,5 µl) de enzima, 1µl de tampón Tango 10X y 8µl de agua desionizada. Incubamos la mezcla anterior en un baño a 37° C durante 3-4 horas. Posteriormente, los productos de digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio y visualización en una lámpara de luz ultravioleta. Según el genotipo de los individuos, obtuvimos tres patrones distintos:

- Genotipo 8377GG: La enzima reconoce ambos alelos y genera fragmentos de 267 pb y 233 pb.
- Genotipo 8377GT: La enzima reconoce el alelo G y no el T, generando fragmentos de 500 pb, 267 pb, y 233 pb.
- Genotipo 8377TT: La enzima no reconoce ninguno de los dos alelos y obtenemos un fragmento único de 500 pb.

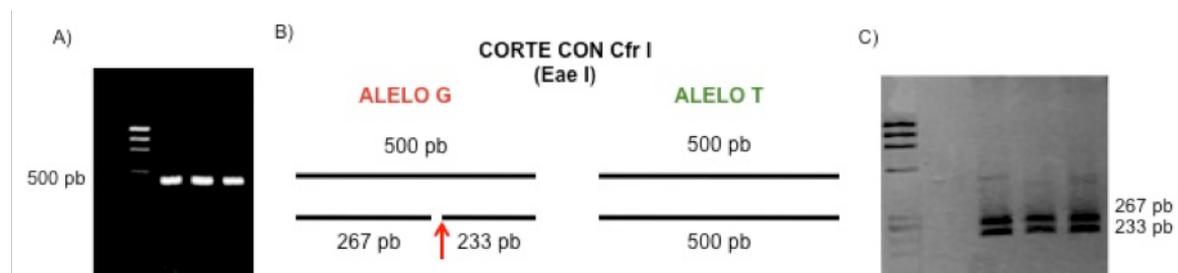


Figura 16: a) Productos de PCR del exón 18 de BRCA2, b) Patrón de corte de CfrI, c) Fragmentos obtenidos de la digestión. Todos los individuos son homocigotos GG. El primer carril en a) y b) es el marcador de peso molecular.

Las muestras de los individuos que mostraban el patrón correspondiente a los alelos menos frecuentes fueron confirmadas mediante secuenciación automática.

10.- SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador ABI 377 (AppliedBiosystems) en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigación del Cáncer (CIC).

Para la preparación de las muestras, éstas se separaron en geles de agarosa y se purificó el fragmento mediante el reactivo comercial “High Pure Product Purification Kit” (Roche). Este reactivo se basa en la capacidad del DNA de unirse a membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas: en primer lugar el producto de PCR o el fragmento de agarosa que lo contiene se disuelven en una solución tampón con isotiocianato de guanidina. El DNA queda retenido en la superficie de sílice de la matriz mientras el resto de los compuestos son eluidos a través de la columna al centrifugar. Después el DNA se lava con un tampón que contiene etanol y finalmente se eluye con una solución tampón de baja concentración salina.

Se preparó una muestra con el cebador sentido y otra con el cebador antisentido a una concentración de 3 pmol cada uno en un volumen de 2 μ L. El DNA se preparó a una concentración de 40 – 60 ng para un volumen final de 8 μ L.

11.- ANÁLISIS DE GRANDES ALTERACIONES GENÓMICAS MEDIANTE MLPA.

Para el estudio de grandes pérdidas/amplificaciones genómicas de los genes BRCA1 y BRCA2 se empleó la técnica de amplificación por PCR multiplex dependiente de ligación (MLPA). Es un método empleado para establecer el número de copias existente hasta en 45 secuencias de DNA en una única reacción. Fue descrito por Schouten en 2002 (Schouten et al., 2002) y consta de cuatro etapas: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación.

El reactivo de MLPA consta de dos sondas diferentes para cada exón totalmente específicas. Cada una de las sondas lleva incorporado uno de los oligonucleótidos universales empleados para la amplificación final de los fragmentos. Con ello se reduce la inespecificidad de la técnica, puesto que es imprescindible que ambas sondas reconozcan las regiones de unión para que se lleve a cabo la amplificación.

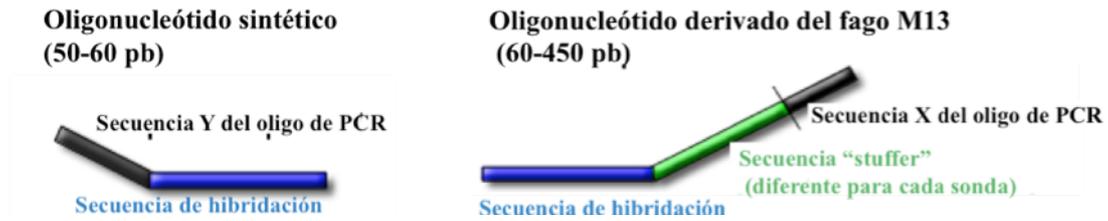


Figura 17: Esquema de las sondas de MLPA

En un primer paso, la mezcla de las sondas de MLPA se añade al DNA genómico desnaturalizado. Las dos partes de la sonda hibridan con secuencias diana adyacentes.



Figura 18: Etapa de hibridación de sondas para MLPA

Las sondas se ligan mediante una enzima ligasa termoestable.

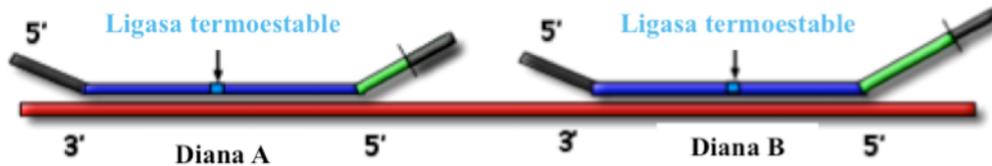


Figura 19: Etapa de ligación de las sondas para MLPA.

Para amplificar las sondas ligadas se emplea una pareja de oligonucleótidos universales, dando lugar a tantos productos de amplificación como sondas empleadas. Estos productos se someten a cromatografía capilar y el resultado se visualiza en forma de electroferograma.

Se utilizó para BRCA1 el reactivo comercial “SALSA MLPA KIT P002B BRCA1”(MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). El reactivo contiene sondas para todos los exones de BRCA1 salvo el exón 4. La mezcla consta de 34 sondas diferentes, cuyos productos de amplificación varían entre las 127 y 454 pb, así como 7 fragmentos control que generan productos menores de 130 pb. La diferencia entre productos de amplificación consecutivos es de 6 a 9 pb.

Por otro lado, la mezcla de sondas contiene cuatro fragmentos control “DQ” (“DNA quantity”) que dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76, y 82 pb. Estos fragmentos sirven de control, ya que serán más evidentes si la cantidad de DNA de nuestras muestras es muy baja. Estos fragmentos no requieren una reacción de ligación para ser amplificados, por lo que son visibles incluso cuando falla la etapa de ligación. Además, en la mezcla encontramos otros fragmentos control “DD” (DNA denaturation”) de 88,92 y 96 pb, que consisten en 2 sondas sintéticas y cuyo propósito es avisarnos de que el DNA no se ha desnaturalizado por completo: el fragmento de 88 pb y el de 96 pb son específicos de secuencias que se localizan en islas CpG muy difíciles de desnaturalizar. Si los productos de amplificación de estos son mucho menores que los de 92 y 127-454 pb, entonces la desnaturalización del DNA de nuestras muestras puede haber sido incompleta y nuestros resultados poco fiables.

En la tabla 15 se recogen las sondas utilizadas para la detección de grandes reordenamientos en el gen BRCA1.

Tabla 15: Sondas de MLPA para el gen BRCA1

Nombre de la sonda	Longitud en pares de bases	Posición en el gen de las sondas internas	Zona donde liga la sonda (según NM_007294.2 de genebank)	Posición cromosómica de las sondas externas
BRCA1 probe 0763-L0268	148	Exón 1A	160-159 antisentido	
BRCA1 probe 0765-L0270	166	Exón 2	216-217	
BRCA1 probe 0826-L0341	175	Exón 3	303-304	
BRCA1 probe 0767-L0272	184	Exón 5	361-362	
BRCA1 probe 0827-L0342	208	Exón 6	441-442	
BRCA1 probe 0769-L0274	217	Exón 7	605-606	
BRCA1 probe 1004-L0569	226	Exón 8	686-687	
BRCA1 probe 1005-L0581	235	Exón 9	781-782	
BRCA1 probe 0772-L0277	244	Exón 10	821-822	
BRCA1 probe 0830-L0345	268	Exón 11	962-963	
BRCA1 probe 0774-L0279	277	Exón 11	3778-3779	
BRCA1 probe 0775-L0280	286	Exón 12	4345-4346	
BRCA1 probe 2603-L2074	295	Exón 13	4441-4442	
BRCA1 probe 0833-L0349	304	Exón 14	4616-4617	
BRCA1 probe 0778-L0347	328	Exón 15	4750-4751	
BRCA1 probe 0779-L0003	337	Exón 16	4906-4907	
BRCA1 probe 0780-L0283	346	Exón 17	5214-5215	
BRCA1 probe 0781-L0284	355	Exón 18	5294-5295	
BRCA1 probe 0782-L0285	364	Exón 19	5369-5370	
BRCA1 probe 0783-L0356	388	Exón 20	5430-5431	
BRCA1 probe 0784-L0287	397	Exón 21	5504-5505	
BRCA1 probe 0785-L0288	406	Exón 22	5578-5579	

BRCA1 probe 0786-L0289	415	Exón 23	5622-5623	
BRCA1 probe 2831-L2260	424	Exón 24	6242-6243	
BRCA1 probe 0764-L0269	157	Exón 1B	3672-3673 (según la secuencia de genbank L78833)	
Control probe 0797-L0093	127			5q31
Control probe 0662-L0158	136			6p21
Control probe 2946-L3265	198			7q
Control probe 0518-L0098	256			2q14
Control probe 0495-L0303	316			12p12
Control probe 0655-L0304	376			4q26
Control probe 0596-L0083	436			11p13
Control probe 0678-L0124	445			12p13
Control probe 0673-L0117	454			3p21
Fragmentos control "DQ"	64,70,76,82			
Fragmentos control "DD"	88,92,96			

Para BRCA2, se utilizó el reactivo comercial "SALSA MLPA KIT P045 BRCA2/CHEK2". Este reactivo contiene sondas para 25 de los 27 exones codificantes de BRCA2. Hay dos sondas para el exón 1 y el 11, y no hay sondas para los exones 5 y 23 ya que están muy próximos a los exones vecinos y/o son zonas muy ricas en adenina/timina. Como control, se añaden 13 sondas para otros genes localizados en distintos cromosomas, dos de ellas aguas arriba y abajo de BRCA2.

Además, se incluyen tres sondas para el gen CHEK2. Una de ellas solo amplifica en caso de que esté presente la mutación 1100delC. Las otras dos indicarían si hay cambios en el número de copias del gen.

Las sondas tienen productos de amplificación entre 130 y 481 pb, así como 5 fragmentos control que dan lugar a productos de amplificación menores de 130 pb. La mezcla contiene cuatro fragmentos control "DQ" ("DNA quantity") que dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76, y 82 pb (igual que para BRCA1). Además, también contiene un producto de amplificación de 92 pb como control de la ligación.

En la siguiente tabla se recogen los nombres, posición y longitud de las sondas.

Tabla 16: Sondas de MLPA para el gen BRCA2

Nombre de la sonda	Longitud en pares de bases	Posición en el gen de las sondas internas	Zona donde liga la sonda	Secuencia de referencia Genbank	Posición cromosómica de las sondas externas
BRCA2 probe 2283-L01774	139	Exón 1	Región promotora	Z74739	

BRCA2 probe 2285-L01776	148	Exón 1	Región promotora	Z74739	
BRCA2 probe 2486-L01985	166	Exón 2	271-270 antisentido	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1599-L1181	175	Exón 3	472-473	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1600-L1182	193	Exón 4	570-571	NM_000059.1	
BRCA2 probe 4585-L03983	346	Exón 6	728-727 reverse	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1601-L01183	202	Exón 7	765-766	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1602-L01184	220	Exón 8	236-237	X95158.1	
BRCA2 probe 1603-L01185	229	Exón 9	1001-1002	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1604-L01186	247	Exón 10	1374-1375	NM_000059.1	
BRCA2 probe 2279-L01770	256	exón 11	2192-2193	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1606-L01188	274	exón 11	6992-6993	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1607-L01189	283	Exón 12	297-298	X95162.1	
BRCA2 probe 2280-L01771	301	Exón 13	7216-7215 antisentido	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1609-L01191	310	Exón 14	7245-7246	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1610-L01192	328	Exón 15	7762-7763	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1611-L01193	337	Exón 16	7975-7976	NM_000059.1	
BRCA2 probe 2281-L01772	355	Exón 17	8158-8157 antisentido	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1613-L01195	364	Exón 18	8482-8483	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1614-L01196	382	Exón 19	8602-8603	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1615-L01197	391	Exón 20	8788-8789	NM_000059.1	
BRCA2 probe 2069-L01970	409	Exón 21	8909-8910	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1617-L01199	418	Exón 22	9100-9101	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1618-L01200	436	Exón 24	9408-9409	NM_000059.1	
BRCA2 probe 5090-L4508	445	Exón 25	9655-9666	NM_000059.1	
BRCA2 probe 4586-L03984	463	Exón 26	9786-9787	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1621-L1203	472	Exón 27	10094-10095	NM_000059.1	
CG018 probe 2144-L01619	454				Aguas abajo de BRCA2
FRY probe 2143-L1618	161				Aguas arriba de BRCA2
CHEK2 probe 2578-L2040	265				Región promotora de CHEK2 en 22q
CHEK2 probe 2579-L2041	400	Exón 9			22q
CHEK2 probe 1772-L1336	490	Exón 11	Específica para detectar 1100delC		22q
Control probe 0681-L0154	373				4
Control probe 1217-L00694	184				4
Control probe 0797-L0463	130				5q31
Control probe 1344-L00555	211				9
Control probe 0517-L00097	238				2
Control probe 0990-L00567	292				11
Control probe 2144-L01619	400				13
Control probe 1240-L0787	427				8
Control probe 1042-L0791	319				8
Control probe 1060-L00628	481				17
Synthetic control probe	92				2q14
Fragmentos control "DQ"	64,70, 76,82				

Se aplicó el protocolo recomendado por el fabricante, con una etapa de hibridación a 60° C durante 16 horas, una de ligación a 54° C durante 15-20 minutos, y una de

polimerización que es la PCR propiamente dicha. En la tabla 17 se recoge el programa de PCR empleado. El volumen final de reacción fueron 40 µl.

Tabla 17: Programa de amplificación de MLPA de los genes BRCA1 y BRCA2

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95° C	30''	X 35 ciclos
60° C	30''	
72° C	1'	
72° C	20'	

Para visualizar los resultados se preparó para cada muestra: 12 µl de formamida desionizada, 0.2 µl del marcador de tamaño marcado con ROX (GeneScan™-500) y 1 µl del producto de PCR. Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI Prism 3700 (PE Applied Biosystems) y se visualizaron los resultados mediante el software GeneScan 3.5. El análisis se realiza mediante comparación del electroferograma obtenido de cada muestra y uno procedente de un control. La pérdida de una copia de la secuencia de un exón supone una reducción del 35-55% del área relativa del pico de amplificación. La ganancia de 2 a 3 copias de la secuencia estudiada da lugar a un incremento del 30-55% en el área relativa del pico de amplificación. La desviación estándar en el área de cada pico debe ser menor del 10% para todas las sondas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

12.- PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS

El análisis de la conservación interespecífica de la secuencia proteica en BRCA1 y BRCA2 se llevó a cabo mediante el programa informático ClustalW (<http://align.genome.jp/>), introduciendo las secuencias a comparar en formato FASTA.

El estudio del comportamiento teórico de determinadas mutaciones “missense UV” (variantes sin clasificar) se llevó a cabo mediante el empleo de cuatro programas informáticos (SIFT, PolyPhen, SNPS3D y Pmut). Además se empleó el programa bioinformático ESEfinder para predecir de forma teórica el efecto de las mutaciones sobre el procesamiento del mRNA.

- **PolyPhen (Polymorphism Phenotyping)**

(<http://www.bork.emblheidelberg.de/PolyPhen>)

Este programa predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína humana, empleando consideraciones físicas y comparativas (Stitzel et al., 2003; Nakken et al., 2007).

La secuencia de la proteína se introduce en el programa en formato FASTA. Se lleva a cabo un alineamiento de la misma con las secuencias pertenecientes a las proteínas homólogas en las especies que se encuentren descritas en BLAST. El resultado del alineamiento múltiple es empleado por el software PSIC (Position-Specific Independent Counts) para calcular la matriz del perfil. Los elementos de la matriz (valores del perfil) son ratios logarítmicos que indican la probabilidad de que en una posición determinada se encuentre un aminoácido, frente a que este aminoácido se localice en cualquier posición (frecuencia de fondo). El programa PolyPhen analiza los valores absolutos de la diferencia entre los valores de perfil de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Un valor muy alto de esta diferencia podría indicar que la sustitución estudiada aparece poco o nada en la familia de proteínas. PolyPhen también muestra el número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda. Este número indica la credibilidad de los cálculos del valor del perfil.

Los resultados del estudio pueden determinar que el cambio es:

- Probablemente patogénico: existe una gran probabilidad de que afecte a la estructura o a la función de la proteína.
- Posiblemente patogénico: se cree que podría afectar a la función o estructura de la proteína.
- Benigno: es muy probable que carezca de efecto fenotípico.
- Desconocido: en algunos casos, la carencia de datos no permite que el programa pueda hacer una predicción.

La tabla 18 muestra las bases empleadas por el programa para llevar a cabo la predicción del efecto del SNP en la función y estructura de la proteína.

Tabla 18: Bases del programa Polyphen

Base			PREDICCIÓN	Base	Efecto
diferencia en valores de PSIC	Propiedades del sitio de sustitución	Propiedades del tipo de sustitución			
arbitraria	Sitio funcional+	arbitraria	Probablemente patogénica	Anotación secuencia	Sitio funcional
arbitraria	Sitio de formación de uniones++	arbitraria	Probablemente patogénica	Anotación secuencia	Estructural, formación de uniones
arbitraria	En regióntransmembrana	Diferencia de la matriz PHAT producida por la sustitución negativa	Posiblemente patogénica	Anotación secuencia	Sitio funcional, transmembrana
arbitraria	En regióntransmembrana		Posiblemente patogénica	Anotación secuencia	
<=0.5	arbitraria	arbitraria	Benigna	Alineamiento múltiple	
>1.0	Átomos a menos de 3Å del ligando	arbitraria	Probablemente patogénica	Estructura	funcional, funcional site, ligand binding (2.2.3)
	Átomos a menos de 3Å del sitio de unión	arbitraria	Probablemente patogénica	Estructura	Sitio funcional, indirecto
En el intervalo (0.5..1.5]	Con accesibilidad <=15%	Cambio tendencia superficie accesible >=0.75	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, alteración hidrofobicidad
		Cambio volumen cadena lateral >=60	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, sobreempaquetamiento
		Cambio volumen cadena lateral <=-60	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
	Con accesibilidad <=5%	Cambio tendencia superficie accesible >=1.0	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, alteración hidrofobicidad
		Cambio volumen cadena lateral >=80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, sobreempaquetamiento
		Cambio volumen cadena lateral <=-80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
En el intervalo (1.5..2.0]	arbitraria	Cambio tendencia superficie accesible >=1.0	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, alteración hidrofobicidad
		Cambio volumen cadena lateral >=80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, sobreempaquetamiento
		Cambio volumen cadena lateral <=-80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
	arbitraria	arbitraria	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
>2.0	arbitraria	arbitraria	Probablemente patogénica	Alineamiento múltiple	

- SNPS3D (<http://www.snps3d.org/>)

Este programa basa su predicción en la hipótesis de que muchos SNPs patogénicos afectan a la función de la proteína disminuyendo la estabilidad proteica. Emplea el software

SVM (Support Vector Machine) para encontrar el patrón de diferenciación entre los SNPs asociados a enfermedad y los neutrales. La tasa de falsos positivos y negativos es de 15% y 26%, respectivamente (Yue et al., 2006a).

También emplea un segundo modelo que se basa en el análisis de la homología de secuencia en familias de proteínas relacionadas con proteínas humanas. El nivel de conservación de una posición de SNP y la probabilidad de observar una variación en una familia hace posible distinguir entre mutaciones patogénicas y neutrales, con una tasa de falsos positivos y negativos del 10 y 20%, respectivamente (Yue and Moulton, 2006b).

Un resultado positivo para el valor de SVM indica que se trata de una variante clasificada como neutral, mientras que un valor negativo la identifica como un cambio patogénico. Cuanto mayor es el valor, más probable es la clasificación. La precisión es significativamente mayor para los valores mayores de 0.5 o menores de -0.5. Para las variantes que afectan más a la función de la proteína que a la estabilidad, el modelo de estabilidad es positivo y el modelo del perfil debe ser negativo. La precisión es significativamente mayor cuando los dos métodos coinciden (Yue and Moulton, 2006a).

- **Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>)**

Es un programa que predice si una mutación puede ser patogénica o neutral. Se basa en las características de la secuencia y en un software de una o dos redes neurales NN (neural network), que emplean bases de datos internas, predicción de estructura secundaria y conservación de la secuencia. Proporciona una respuesta afirmativa o negativa y un índice de credibilidad (Ferrer-Costa et al., 2005).

Se introduce la secuencia proteica a estudiar en formato FASTA y se incluye la localización y el cambio aminoacídico que se produce. Proporciona resultados que varían en un rango de 0 a 1, donde un valor 0 indica que se trata de una mutación neutral y los valores más altos son patogénicos. También se muestra la mutación en relación a la estructura proteica. La tasa de error por falsos positivos es de un 21% y por falsos negativos es de un 17%. Si se incluye la estructura de la proteína, la tasa de falsos positivos se reduce a un 12% y la de falsos negativos a un 10%.

- **SIFT (“Sorting intolerant from tolerant”)**
(<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)

El programa SIFT es una herramienta que clasifica las sustituciones de aminoácidos en una proteína dada y predice si estos cambios provocarán un efecto fenotípico en la proteína.

SIFT se basa en la premisa de que los aminoácidos importantes de una proteína están conservados en la evolución, por lo que cambios en los mismos deben afectar a la funcionalidad de la proteína. Con una secuencia proteica dada, SIFT escoge proteínas relacionadas y obtiene un alineamiento múltiple de estas con la proteína a analizar, y basándose en los aminoácidos presentes en cada posición del alineamiento realiza una predicción de las sustituciones que afectarán a la función de la proteína. Las sustituciones en una posición conservada en el alineamiento serán consideradas como “no tolerables” para la mayoría de los cambios, mientras que las posiciones que no están conservadas en el alineamiento tolerarán mejor los cambios de aminoácido (Ng and Henikoff 2001).

Se introduce la secuencia a analizar en formato FASTA y el programa primero busca secuencias similares a la introducida por nosotros, después escoge secuencias estrechamente relacionadas que puedan tener una función similar a la nuestra, y luego obtiene el alineamiento de las secuencias escogidas. Por último, calcula las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento. Las sustituciones con una puntuación menor de 0,05 serán clasificadas como deletéreas, y las de puntuación mayor o igual a 0,05 “tolerables” o neutrales.

La precisión de las predicciones de SIFT es del 60-80%, obteniéndose un 30% aproximadamente de falsos positivos. No obstante, la precisión de las predicciones depende del alineamiento que se obtenga en cada caso. En algunos trabajos han utilizado esta herramienta como método para la clasificación de mutaciones puntuales en BRCA1 y BRCA2 (Rajasekaran 2007 y 2008).

- **ESEfinder**(<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>)

Para saber si las variantes en la secuencia afectan a los sitios consenso de unión de las proteínas SR (Serine/Arginine-rich proteins) y se altera la unión de éstas en los sitios ESE (Exon splicing Enhancers o sitios exónicos de potenciación del procesamiento) utilizamos el

programa de predicción ESEfinder (Smith et al., 2006; Cartegni et al., 2003). Para ello, se introduce la secuencia normal y la secuencia con el cambio y el programa valora la presencia de secuencias ESE en la secuencia normal y su posible variación por la presencia del cambio nucleotídico. A nivel general, se consideran significativos los cambios exónicos que hacen que desaparezca algún sitio ESE.

El programa estudia el cambio en los sitios consenso de unión de las proteínas SF2/ASF, SF2/ASF (IgM-BRCA1), SC35, SRp40 y SRp55. Considera los siguientes valores umbral para cada una de ellas:

Tabla 19: Valores umbral para las diferentes proteínas de procesamiento.

Proteína	Valor umbral
SF2/ASF	1.956
SF2/ASF (IgM-BRCA1)	1.867
SC35	2.383
SRp40	2.67
SRp55	2.676

Como valor umbral se considera el valor mínimo para que una secuencia determinada se considere significativa para la unión de alguna de las proteínas de procesamiento.

El programa también permite obtener una representación gráfica de los sitios de unión de las proteínas en la secuencia estudiada. La secuencia analizada se representa en el eje X del gráfico. Sólo se representan los valores que superan el umbral. La altura de las barras corresponde a los valores del motivo, la anchura corresponde a la longitud del motivo de unión (6, 7 u 8 nucleótidos) y cada una de las proteínas tiene un código de color. Como ejemplo se muestra una secuencia de BRCA1, donde se representan los diferentes sitios de unión de las proteínas del procesamiento exón-intrón.

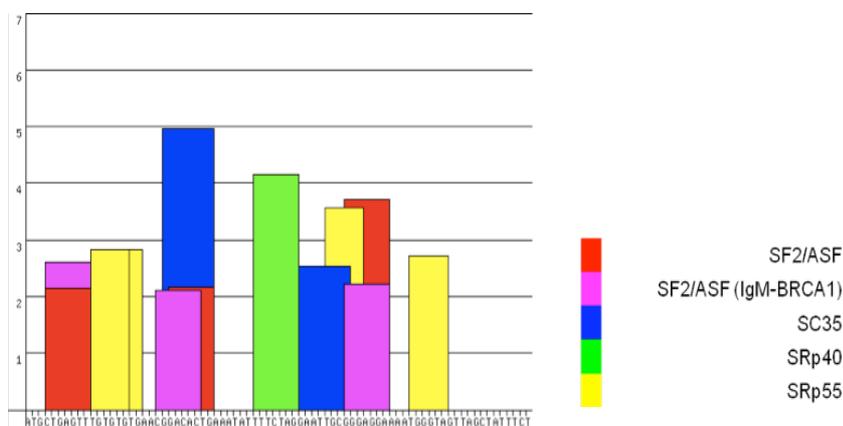


Figura 20: Gráfico que muestra los diferentes sitios de reconocimiento de las proteínas de procesamiento en una secuencia de DNA dada.

RESULTADOS

1.- MUTACIONES PUNTUALES ENCONTRADAS EN BRCA1 Y BRCA2

Se llevó a cabo el rastreo de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 en 343 probandos. En total detectamos 110 mutaciones puntuales diferentes, 51 en BRCA1 y 59 en BRCA2.

Hemos catalogado las alteraciones encontradas en patogénicas, polimorfismos y variantes sin clasificar, en función de su descripción en el BIC, el efecto que tienen sobre la proteína y las referencias bibliográficas.

Cabe destacar que todas las mutaciones en este trabajo tienen la misma nomenclatura que en el BIC.

1.1- MUTACIONES PATOGENICAS

Las variantes patogénicas son la causa principal del alto riesgo a cáncer de mama y/o ovario y las responsables de la aparición de la enfermedad. Antes de enumerar las mutaciones patogénicas encontradas, debemos hacer algunas aclaraciones: las mutaciones de cambio de fase de lectura o aparición de un codon de parada prematuro, al generar una proteína truncada se consideran como patológicas. La excepción a esta norma la constituye la mutación en el exón 27 de BRCA2 A10204T (p.K3326X) que, tras un estudio mas exhaustivo, y teniendo en cuenta los datos bibliográficos hemos considerado como un polimorfismo. Asimismo, las mutaciones que afectan a los sitios clásicos de procesamiento de intrones en los extremos 5' y 3' de los exones son generalmente consideradas como mutaciones patogénicas de maduración aunque sean de nueva descripción. Sin embargo, se requiere un estudio posterior del RNAm para confirmar la alteración en la maduración del RNA.

1.1.1.- MUTACIONES PATOGENICAS EN BRCA1

De las 51 mutaciones encontradas en BRCA1, 9 fueron consideradas patogénicas. Siete de ellas ya estaban descritas y caracterizadas en la bibliografía, y dos son de nueva descripción. En concreto, de las ya descritas hay tres mutaciones que cambian el marco de lectura por inserciones o pérdidas, un cambio de nucleótido que da lugar a un codon de parada prematuro, una mutación que altera el procesamiento del RNA, y dos cambios de aminoácido que son considerados patogénicos. Las dos mutaciones nuevas que describimos

en el presente trabajo son un cambio de fase de lectura y una mutación intrónica que altera la maduración del RNA.

A continuación describiremos más en detalle las mutaciones encontradas.

A) CAMBIOS EN EL MARCO DE LECTURA:

Hemos encontrado cuatro alteraciones que provocan un desfase del marco de lectura y dan lugar a un codon de parada prematuro (tres pérdidas y una inserción). Por otro lado, todas las variantes de este grupo inducen la aparición de una proteína BRCA1 truncada y no funcional ya que carece de algunos de los dominios importantes para su actividad.

Las características de estas mutaciones se detallan en la tabla 20.

Tabla 20: Mutaciones patogénicas que cambian el marco de lectura encontradas en BRCA1 y características de las mismas. Notación de las mutaciones según referencia Genbank U14680.

MUTACIÓN	CODON	EXÓN	EFEECTO EN LA PROTEÍNA	VECES EN BIC	REFERENCIA HGMD	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
1793delA	558	11	Codon de parada en 571	6	No está	Judkins et al., 05 (a) Spearman et al., 08.
2031delG	638	11	Codon de parada en 650	1	CD032726	Diez et al., 2003.
3533insA	1138	11	Codon de parada en 1140	No está	No está	No publicada
4284delAG	1389	12	Codon de parada en 1389	11	CD982496	Dong et al., 1998.

Tabla 21: Criterios para inclusión de familias en el estudio genético de BRCA1 y BRCA2 y notación utilizada en esta sección.

CRITERIO	SIGNIFICADO
A	Un caso de cáncer de mama bilateral
B	Un caso de cáncer de mama u ovario antes de los 40 años
C	Un caso de cáncer de mama en el varón
D	Dos casos de cáncer de mama en primer grado, uno de ellos antes de los 50 años
E	Un caso de cáncer de mama antes de los 50 años y otro de ovario (en primer o segundo grado)
F	Dos casos de cáncer de ovario a cualquier edad (en primer o segundo grado)
G	Tres o mas casos de cáncer de mama, dos de ellos al menos en primer grado
H	Otros casos, según valoración de la unidad de consejo genético

A continuación se detallan las características clínicas de las familias en que aparecieron las mutaciones patogénicas de cambio en la fase de lectura.

Tabla 22: Características de las familias en que aparecieron las pérdidas en inserciones patogénicas.

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
1793delAG	137	Cáncer de mama bilateral a los 53 y 58 años.	3	1	1 ORL	2	A,D,E,G
	228	Cáncer de ovario a los 59 años.	2	2	1 aplasia medular 1 ORL 1 renal	1	F, G
	259	Cáncer de ovario a los 62 años.	4, uno de ellos bilateral	1	1 de pulmón	3	A,B,D,F,G
2031delG	238	Cáncer de mama a los 58 años y de ovario a los 62.	0	0	1 de estómago	3	H
	331	Cáncer de mama a los 51 años.	2	2	1 de hueso 1 de pulmón 2 ORL	1	F, G
3533insA	368	Cáncer de mama a los 50 años.	1 bilateral	0	2 de pulmón 1 de útero	6	A, B, D
4284delAG	226	Cáncer de mama bilateral a los 31 y 36 años.	2	0	0	4	A, B, G

* Familiares estudiados incluyendo al probando.

Cabe resaltar que la mutación 2031delG fue descrita por nuestro laboratorio en el artículo de Diez et al. (2003). Desde su descripción en el BIC por nuestro grupo ningún otro la ha registrado de nuevo hasta la fecha.

Por otro lado, la mutación 3533insA no aparece registrada en las bases de datos BIC y HGMD, y no está descrita en la bibliografía por lo que consideramos que es de nueva descripción. Al provocar un cambio en la fase de lectura, un codon de parada prematuro en posición 1140 y una proteína presuntamente no funcional, la hemos considerado patogénica.

B) MUTACIONES SIN SENTIDO (“nonsense”):

Estas mutaciones son aquellas en que un cambio de base da lugar a un codón de parada prematuro. Encontramos una mutación de este tipo, el cambio de citosina por timina en posición 1806 (C1806T), que en la proteína da lugar al cambio de una glutamina por un codon de parada (Q563X). Esta mutación se localiza en el exón 11 de BRCA1 y fue detectada mediante CSGE. Presenta 88 entradas en el BIC y también aparece registrada en el

HGMD (CM950144) (Shattuck-Eidens et al., 1995; Wagner et al., 1998; Johannsson et al., 2003).

Esta mutación apareció en tres de las familias estudiadas, cuyas características clínicas se detallan a continuación:

Tabla 23: Características de las familias en que apareció la mutación C1806T (Q563X).

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
C1806T (Q563X)	77	Cáncer de ovario a los 69 años.	5	0	1 pulmón	2	E, G
	87	Cáncer de mama a los 39 años. Exitus.	3	0	0	8	B, D, G
	412	Cáncer de ovario a los 38 años.	0	1	0	1	B, F

* Familiares estudiados incluyendo al probando.

C) CAMBIOS DE AMINOÁCIDO PATOGENICOS

Son aquellas mutaciones que con un simple cambio de aminoácido tienen un efecto patogénico. Su caracterización requiere ensayos que determinen que la funcionalidad de la proteína se ve gravemente afectada por la mutación, así como estudios poblacionales y de segregación.

Encontramos dos mutaciones de este tipo C5242A (A1708E) y G5236A (G1706E).

- C5242A (A1708E):

Este cambio de citosina por adenina en posición 5242 da lugar a un cambio de alanina por glutámico en posición 1708. Se localiza en el exón 18 de BRCA1, y en nuestro estudio apareció en dos familias (132 y 139). Esta mutación consta de 45 registros en el BIC, de diverso origen étnico y nacionalidad. También aparece registrada en el HGMD (CM950153). Su localización en el dominio BRCT indujo a pensar que podía presentar importancia clínica. El alelo 1708E aumenta la susceptibilidad a la acción de proteasas (Williams et al., 2003). Por otro lado, esta mutación bloquea la actividad inhibitoria de BRCA1 (Li et al., 2002) y, en particular, elimina la represión del receptor de estrógenos dependiente de BRCA1 (Zheng et al.,

2001). Posteriormente se descubrió que el alelo 1708E provoca la localización de BRCA1 en el citoplasma impidiéndole realizar sus funciones nucleares. Además, la presencia del alelo 1708E altera la función transactivadora de BRCA2 e induce amplificación de los centrosomas (Lovelock et al., 2006, 2007). Por todas estas alteraciones funcionales que provoca, se ha clasificado este cambio de aminoácido como patogénico (Futreal et al., 1994; Humphrey et al., 1997; Greenman et al., 1998; Vallon-Christerson et al., 2001; de la Hoya et al., 2002 (a y b); Kawai et al., 2002; Figge et al., 2004; Infante et al., 2006; Gough et al., 2007; Torres et al., 2007).

Tabla 24: Características de las familias en que apareció la mutación C5242A (A1708E).

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
C5242A (A1708E)	132	Cáncer de mama a los 32 años.	2	0	0	2	B, D, G
	139	Cáncer de mama a los 33 años.	0	1	1 de colon 1 de pulmón	2	B, E

* Familiares estudiados incluyendo al probando.

- G5236A (G1706E):

Este un cambio de guanina por adenina en posición 5236 da lugar a un cambio de glicina por glutámico en la proteína en posición 1706. Se localiza en el exón 18 de BRCA1 y apareció en dos familias en nuestro estudio. Esta alteración presenta siete entradas registradas en el BIC, donde la catalogan como “variante sin clasificar”. Sin embargo, este cambio de aminoácido, en la población española se considera patogénico. Se ha visto que el cambio de un aminoácido pequeño e hidrofóbico por uno hidrofílico cargado en posición 1706 altera la estructura tridimensional de la proteína. Además, en ensayos funcionales se ha visto que esta mutación reduce la actividad transcripcional de BRCA1 (Osorio et al., 2000; Mirkovic et al., 2004; Carvalho et al., 2007; Abkevich et al., 2004; Williams et al., 2003; Lovelock et al.,

2006). También aparece registrada como patogénica en la base de datos HGMD (CM000502).

Tabla 25: Características de las familias en que apareció la mutación G5232A (G1706E).

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
G5232A (G1706E)	244	Cáncer de mama a los 37 años.	0	0	1 ORL	4	B
	391	Cáncer de mama a los 29 años.	0	0	1 de pulmón 1 de estómago	1	B
* Familiares estudiados incluyendo al probando.							

D) MUTACIONES QUE AFECTAN A LA MADURACIÓN DEL mRNA (o de “splicing”)

Este tipo de mutaciones aparecen tradicionalmente en las fronteras exón-intrón, en el sitio 5' donador (GT) o 3' aceptor (AG). En torno a esos nucleótidos se marcan las fronteras exón-intrón e intrón-exón a la maquinaria de maduración del MRNA para que los intrones sean eliminados correctamente. Cambios en estas secuencias consenso dan lugar a un transcrito alterado que a su vez originará una proteína anómala y no funcional.

Hemos encontrado dos mutaciones de este tipo en BRCA1, una ya descrita y otra nueva, que explicaremos más en detalle a continuación.

- IVS20+1G>A (5396+1G>A):

Esta mutación se localiza en el extremo 3' del exón 20 de BRCA1, donde cambia una guanina por adenina de la secuencia consenso GT a AT. En nuestro estudio apareció en una de las familias (228). De las 42 entradas que posee esta mutación en el BIC, la mayoría pertenecen a individuos de origen caucásico y latino. También aparece registrada en el HGMD (CS013998).

Esta mutación provoca la pérdida del exón 20 (c.5313_5396del) y causa un cambio en la fase de lectura que crea un codón de parada en posición 1737. También provoca la aparición de otro transcrito alternativo en el que se retienen 85 pb del intrón 20, al utilizar un

sitio donador alternativo que está justamente 85 pb aguas abajo en el intrón 20. Este transcrito también presenta un cambio en la fase de lectura y un codon de parada prematuro esta vez en posición 1767 (Shattuck-Eidens et al., 1995; Tesoriero et al., 2005).

Tabla 26: Características de la familia en que apareció la mutación IVS20+1G>A.

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
IVS20+1G>A	229	Cáncer de mama a los 34 años.	5	0	1 leucemia 1 de próstata 1 de hígado	8	B, D, G
* Familiares estudiados incluyendo al probando.							

- IVS23+3A>C (5586+3A>C):

Esta mutación no está registrada en el BIC, HGMD ni en la literatura, por lo que es la primera vez que se describe. Se localiza aguas abajo del extremo 3' del exón 23 de BRCA1, donde cambia una adenina por citosina. Aunque no es uno de los dinucleótidos consenso, al encontrarse muy cerca de los mismos sospechamos que podría afectar al procesamiento del exón 23 en el MRNA.

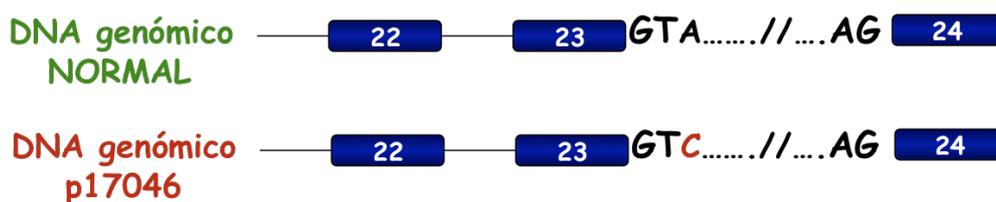


Figura 21: Localización de la mutación de nueva descripción IVS23+3A>C dentro del gen BRCA2.

Para comprobar si esta mutación afectaba a la maduración del exón 23 en primer lugar se extrajo el RNA del paciente portador de la mutación y mediante RT-PCR se obtuvo el cDNA. Después, diseñamos cebadores sentido y antisentido en el exón 17 y 24 respectivamente, para amplificar mediante PCR esa región. Se hizo en paralelo la amplificación de la muestra del paciente y de una muestra control.

El fragmento germinal que comprende los exones 17 al 24 da lugar a un producto de PCR de 436 pb. El exón 23 tiene un tamaño de 61 pb, por lo que al perderse en el paciente por una maduración alternativa obtuvimos dos transcritos, uno de 436 pb y otro menor de 375 pb (figura 22).

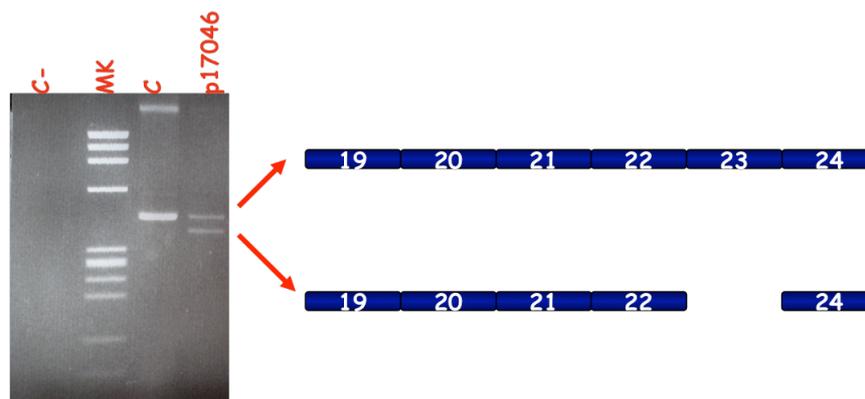


Figura 22: A la izquierda observamos el gel de agarosa con los productos de PCR. En el primer carril hay un control negativo, en el segundo un marcador de tamaño, en el tercero una muestra control y en el cuarto la muestra del paciente portador de la mutación en que se pierde el exón 23.

La pérdida del exón 23 provoca un cambio en la fase de lectura y da lugar a la aparición de un codón de parada prematuro en el exón 24 (residuo 1813 de la proteína). Por lo tanto, se produciría una proteína truncada y presuntamente no funcional.

En la tabla siguiente se detallan las características de la familia en que apareció esta mutación patogénica.

Tabla 27: Características de la familia en que apareció la mutación IVS23+3A>G.

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
IVS23+3A>C	347	Cáncer de mama a los 29 años.	1	0	1 de colon 1 de estómago	5	B

* Familiares estudiados incluyendo al probando.

El exón 23 codifica para parte del extremo carboxilo-terminal de BRCA1, en concreto el segundo dominio BRCT. Este dominio es de gran importancia, ya que interacciona con

múltiples proteínas participando en activación transcripcional, remodelación de cromatina y otras funciones importantes de BRCA1. Por ello, la pérdida del exón 23 dará lugar a una proteína no funcional que carece en parte de su actividad supresora de tumores.

A modo de resumen de este apartado, en la figura siguiente se esquematiza la estructura del gen BRCA1 y las mutaciones patológicas que hemos encontrado en el mismo.

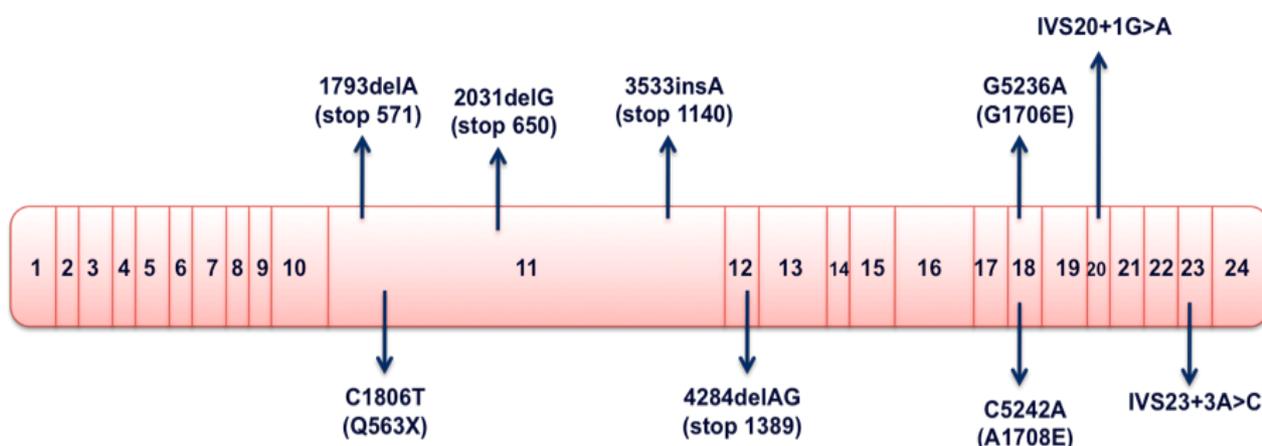


Figura 23: Esquema de las mutaciones patológicas encontradas en BRCA1 y su localización en el gen.

1.1.2.- MUTACIONES PATOGENICAS ENCONTRADAS EN BRCA2

De las 59 mutaciones encontradas en BRCA2, 10 resultaron ser patológicas. En concreto, ocho son cambios en la fase de lectura por inserciones o pérdidas y dos son mutaciones sin sentido en que se genera un codon de parada prematuro.

A) CAMBIOS EN EL MARCO DE LECTURA:

Hemos encontrado ocho mutaciones que cambian la fase de lectura, siete pérdidas y una inserción. De entre ellas, cuatro ya estaban descritas y otras cuatro son de nueva descripción. En todos los casos se genera un codon de parada prematuro que da lugar a una

proteína truncada. Todas estas alteraciones fueron detectadas mediante CSGE y secuenciación automática.

En la tabla 28 se detallan las características de las mutaciones encontradas en BRCA2 que cambian la fase de lectura.

Tabla 28: Mutaciones patogénicas que cambian el marco de lectura encontradas en BRCA2 y características de las mismas. Notación según referencia Genbank U43746.

MUTACIÓN	CODON	EXÓN	EFEECTO EN LA PROTEÍNA	VECES EN BIC	REFERENCIA HGMD	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
3036delACAA	936	11	Codon de parada en 959	105	No está	Spitzer et al., 2000 Duran et al., 2003 Salazar et al., 2006
5319delA	1697	11	Codon de parada en 1704	No está	No está	No publicada
5344delAATA	1706	11	Codon de parada en 1710	No está	No está	No publicada
6503delTT	2092	11	Codon de parada en 2098	93	CD951627	Wooster et al., 1995 Haraldsson et al., 1998 Claes et al., 1999 Khitto et al., 2001 Lubinski et al., 2004 Hartikainen et al., 2007
6678insA	2150	11	Codon de parada en 2175	2	CI022585	Fries et al., 2002
8370del11	2714	18	Codon de parada en 2716	No está	No está	No publicada
8873delACCA	2882	21	Codon de parada en 2889	No está	No está	No publicada
9254delATCAT	3009	23	Codon de parada en 3016	10	CD961862	Tavtigian et al., 1996

A continuación se detallan las características clínicas de las familias en que aparecieron las mutaciones patogénicas de cambio en la fase de lectura.

Tabla 29: Características de las familias en que aparecieron las inserciones y pérdidas patogénicas de BRCA2.

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
3036delACAA	149	Cáncer de mama a los 55 años.	5	0	1 de páncreas 1 de pulmón 1 de estómago	1	B, D, G
	162	Sano. El resto de los parientes afectos habían fallecido.	3	1	0	1	B, D, E, G
	181	Cáncer de mama a los 70 años.	13, 2 de ellos bilaterales	0	1 sarcoma	6	A, B, D, G
	211	Cáncer de mama bilateral a los 48 y 52 años. Cáncer de ovario a los 49.	5, uno de ellos bilateral	0	1 de páncreas	1	A,B,D,E,G
	258	Cáncer de mama a los 34 años.	1	0	1 de páncreas 2 de próstata	1	B
5319delA	325	Cáncer de mama a los 42 años.	1	0	0	1	D
5344delAATA	221	Sano. Parientes estudiados en otro centro.	4	0	0	1	B, D, G
6503delTT	255	Cáncer de mama a los 35 años.	2	0	1 de próstata	6	B, D, G
6678insA	346	Cáncer de mama a los 32 años.	8	0	1 de hígado	1	B, D, G
8370del11	192	Sana. El resto de parientes afectos habían fallecido.	1	0	0	1	H
8873delACCA	98	Cáncer de mama a los 49 años.	1	0	1 de pulmón 1 de próstata 1 de intestino 1 de colon 1 de hígado	2	D
9254delATCAT	173	Cáncer de mama a los 49 años.	3 en línea materna y 7 en línea paterna	0	1 próstata	9	B, D, G

* Familiares estudiados incluyendo al probando.

Cabe destacar que las mutaciones 5319delA, 5344delAATA, 8370del11 y 8873delACCA no habían sido descritas previamente. Como todas ellas provocan un cambio en la fase de lectura y dan lugar a un codon de parada prematuro y a una proteína no funcional las consideramos patogénicas.

La pérdida de 11 nucleótidos a partir del 8370 (8370del11) apareció en una familia cuyo probando era sano y tenía al menos un caso más de cáncer de mama en un pariente de primer grado. Esta familia no cumple los criterios clásicos de inclusión, sin embargo, tras una valoración del caso, la unidad de consejo genético consideró necesario realizar el estudio.

La alteración 9254delATCAT aparece registrada 10 veces en el BIC, en pacientes de origen caucasiano y latino, en concreto hay varias entradas españolas.

B) MUTACIONES SIN SENTIDO (“nonsense”):

Encontramos dos mutaciones en que un cambio de base da lugar a un codón de parada prematuro.

En primer lugar, encontramos un cambio de guanina por timina en posición 373 (G373T), que da lugar al cambio de glutámico por un codon de parada en posición 49 de la proteína (E49X). Esta mutación se localiza en el exón 3 de BRCA2 y fue detectada mediante CSGE y secuenciación automática. E49X presenta 17 entradas en el BIC y también aparece registrada en el HGMD (CM011914) (Bergthorsson et al., 2001).

En segundo lugar encontramos el cambio de citosina por timina en posición 8800 (C8800T), que da lugar al cambio de glutamina por un codon de parada prematuro en posición 2858 de la proteína (Q2858X). Esta mutación se localiza en el exón 20 de BRCA2 y aparece registrada una vez en el BIC y en el HGMD (CM994686) (Santarosa et al., 1999) (b).

Cada una de estas mutaciones apareció en una familia respectivamente. Las características clínicas de las mismas se recogen en la tabla 30.

Tabla 30: Características de las familias en que aparecieron las mutaciones sin sentido en BRCA2.

MUTACIÓN	FAMILIA	PROBANDO	OTROS CASOS CM	OTROS CASOS CO	OTROS TIPOS DE CÁNCER	FAMILIARES ESTUDIADOS *	CRITERIOS DE INCLUSIÓN
G373T (E49X)	415	Cáncer de mama a los 64 años.	3	0	0	1	B, C, D, G
C8800T (Q2858X)	190	Cáncer de mama a los 47 años.	2	0	1 cáncer ORL	3	D, G

* Familiares estudiados incluyendo al probando.

A modo de resumen de este apartado, en la figura 24 se esquematiza la estructura del gen BRCA2 y las mutaciones patogénicas que hemos encontrado en el mismo.

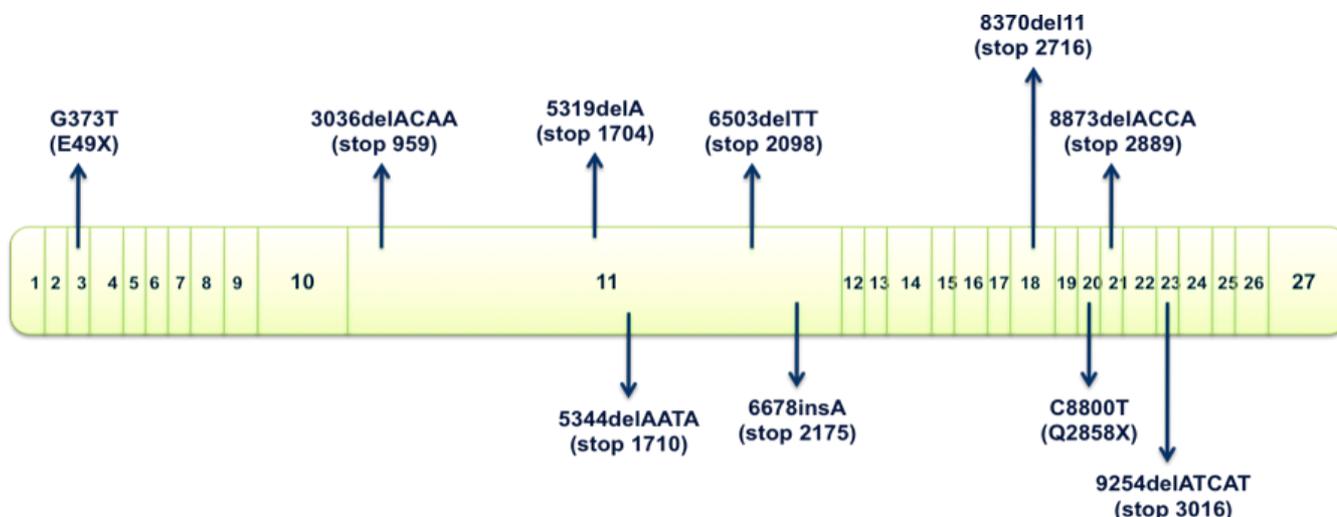


Figura 24: Esquema de las mutaciones patogénicas encontradas en BRCA2 y su localización en el gen.

1.2.- POLIMORFISMOS NEUTRALES

Son aquellas variantes presentes en la población general con una frecuencia mayor del 1%, así como aquellas que en estudios familiares no cosegregan con la enfermedad y, en general, todas aquellas que no son la causa fundamental de la aparición del cáncer. Dentro de este grupo se incluyen tradicionalmente las mutaciones silenciosas, las mutaciones que aparecen en los intrones, en las zonas 5' y 3' no transcritas (zonas UTRs), y aquellas de cambio de aminoácido que no repercuten en la funcionalidad ni estructura de la proteína.

Además de las mutaciones ya descritas, que no tienen consecuencias en la expresión del gen y la actividad de la proteína, existen otras de nueva descripción que hemos incluido en este grupo. La alta frecuencia con que aparecen dichas mutaciones en nuestra población de pacientes puede indicar que también están presentes con frecuencia alta en la población general, pudiendo por ello ser consideradas como polimorfismos. También hemos tenido en cuenta para la clasificación el tipo de cambio de aminoácido, el dominio de la proteína en que se encuentra, la coincidencia con mutaciones patogénicas y la bibliografía disponible.

1.2.1 POLIMORFISMOS DE BRCA1

Hemos encontrado en total 26 variantes neutrales en el gen BRCA1. En concreto, hay 7 mutaciones silenciosas (cambios de nucleótido que no dan lugar a cambio de aminoácido en la proteína), 12 en regiones intrónicas y 7 de cambio de aminoácido. Entre ellas hay una variante silenciosa de nueva descripción.

En la tabla siguiente se detallan las mutaciones silenciosas encontradas en BRCA1.

Tabla 31: Mutaciones silenciosas encontradas en BRCA1

EXÓN	Mutación DNA	Efecto en la proteína	Pacientes en que aparece	Veces en BIC	Importancia clínica BIC	Referencias bibliográficas
9	C710T	C197C	2	31	Neutral	Mckean-Cowdin et al., 05 Diez et al., 03
11	A1100G	T327T	2	1	Desconocida	No hay referencias
11	C2201T	S694S	98	13	Neutral	Frost et al., 05
11	T2430C	L771L	73	25	Neutral	Konstantopoulou et al., 00 Baudi et al., 99
11	A2852G	G911G	1	No está	No registrada	Esteban Cardeñosa et al., 08
13	T4427C	S1436S	120	35	Neutral	Konstantopoulou et al., 00
19	A5294G	E1725E	1	No está	No registrada	Infante et al., 06 Beristain et al., 07

Existen tres mutaciones silenciosas que nos plantearon algunas dudas: A1100G (T327T), A2852G (G911G) y A5294G (E1725E). Estas mutaciones silenciosas aparecen en menos publicaciones y la falta de información sobre las mismas aún hace dudar de su

neutralidad. Por ello, para aportar algún dato más realizamos el estudio de los potenciadores de la maduración del RNA con el programa “ESEfinder”. Esta herramienta realiza una predicción sobre si la presencia de estas mutaciones puede provocar una maduración alternativa.

Encontramos que para A5294G (E1725E) y A2852G (G911G) no había cambios en los potenciadores de maduración (“exonic splicing enhancers” o “ESEs”). Sin embargo, para A110G (T327T) aparece un nuevo sitio de unión a SF2/ASF y aumenta la afinidad de uno ya existente de unión a SRp55. Estos cambios se muestran en la figura 25.

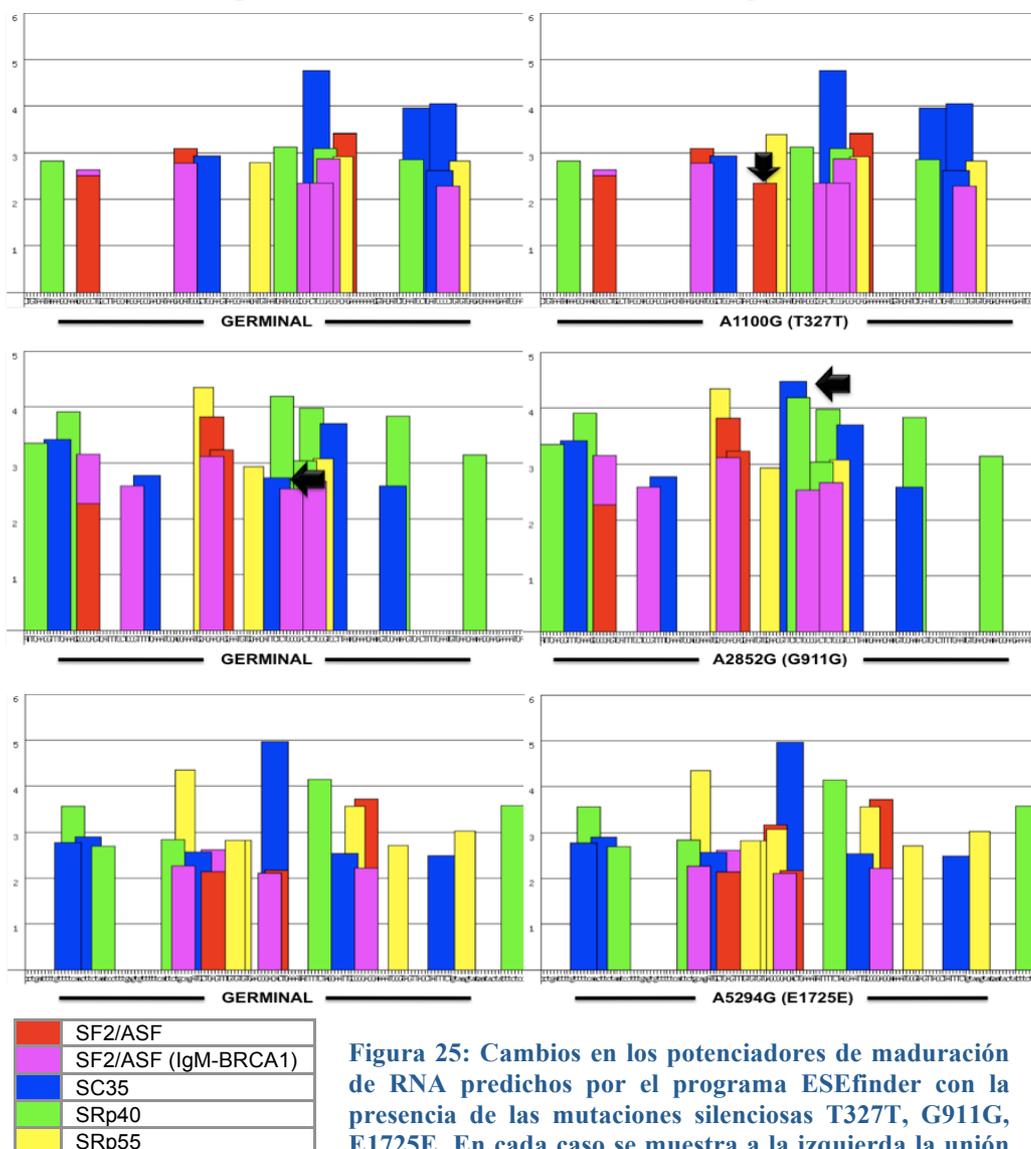


Figura 25: Cambios en los potenciadores de maduración de RNA predichos por el programa ESEfinder con la presencia de las mutaciones silenciosas T327T, G911G, E1725E. En cada caso se muestra a la izquierda la unión de proteínas SRP a la secuencia germinal y a la derecha la unión de dichas proteínas cuando está presente cada mutación.

Estos resultados son solo orientativos. Tan solo la comprobación mediante RT-PCR podría confirmar el cambio en la maduración del RNA.

A continuación en la tabla 32 se recogen los cambios de aminoácido sin importancia clínica encontrados en BRCA1.

Tabla 32: Polimorfismos de cambio de aminoácido encontrados en BRCA1

EXÓN	Mutación DNA	Efecto en la proteína	Pacientes en que aparece	Veces en BIC	Importancia clínica BIC	Referencias bibliográficas
11	A1186G	Q356R	35	82	Desconocida	Durocher et al., 96 Dunning et al., 97 Schoumacher et al., 01 Wenham et al., 03 Auranen et al., 05 Tommasi et al., 08
11	C2731T	P871L	79	26	Neutral	Konstantopoulou et al., 00 Wenham et al., 03 Menzel et al., 04 Auranen et al., 05 Tommasi et al., 05
11	G2196A	D693N	34	16	Neutral	Durocher et al., 96
11	A3232G	E1038G	81	37	Neutral	Konstantopoulou et al., 00 Goumenou et al., 03 Jara et al., 04 Tommasi et al., 05
11	A3667G	K1183R	37%	33	Neutral	Konstantopoulou et al., 00 Tommasi et al., 05 Saxena et al., 06
15	G4654T	S1512I	3	53	Neutral	Deffenbaugh et al., 02 Hadjisavvas et al., 02 Phelan et al., 02 y 05
16	A4956G	S1613G	49%	36	Neutral	Konstantopoulou et al., 00 Tommasi et al., 05 Saxena et al., 06

También encontramos diversas variantes intrónicas en zonas alejadas de los sitios clásicos de procesamiento, por lo que aunque alguna sea de nueva descripción la hemos incluido entre los polimorfismos neutrales.

En la tabla 33 se detallan las variantes intrónicas polimórficas encontradas en BRCA1.

Tabla 33: Variantes intrónicas neutrales encontradas en BRCA1.

INTRÓN	Mutación DNA	Pacientes en que aparece	Veces en BIC	Importancia clínica BIC	Referencias bibliográficas
5'UTR	IVS1-115T>C (101-115T>C)	38%	1	Desconocida	Velasco-Sampedro et al., 02 Song et al., 06 Infante et al., 06
1	IVS2-14C>T (200-14C>T)	5	52	Desconocida	Claes et al., 03 Judkins et al., 05 (a) Beristain et al., 07
6	IVS7-34T>C (561-34T>C)	25%	9	Neutral	Sinclair et al., 00 Sng et al., 03 Hedau et al., 04 Infante et al., 06
7	IVS8-58delT (667-58delT)	37%	8	Neutral	Pyne et al., 99 Sinclair et al., 00 Weitzel et al., 05 Infante et al., 06
9	IVS9+44A>G (712+44A>G)	1	3	Desconocida	No hay publicaciones
12	IVS13-10C>T (4477-10C>T)	3	25	Neutral	Judkins et al., 05 Weitzel et al., 05 Infante et al., 06 Konstantopoulou et al., 07
13	IVS14-63A>G (4604-63A>G)	37%	1	Desconocida	Infante et al., 06
16	IVS17-53C>T (5194-53C>T)	18	2	Desconocida	Jara et al., 06 Infante et al., 2006 Konstantopoulou et al., 2008
18	IVS18+66G>A (5271+66G>A)	35%	9	Neutral	Tworek et al., 99 Sinclair et al., 00 Hedau et al., 04 Kawahara et al., 04 Infante et al., 06
20	IVS20+60insGTATTCCACTCC (5396+60ins12pb)	2	26	Desconocida	Spitzer et al., 00 Sensi et al., 03 Torres et al., 07
22	IVS22+8T>C (5525+8T>C)	1	14	Neutral	Panguluri et al., 99 Weber et al., 06
24	IVS24+36C>G (5711+36C>G)	2	No está	Desconocida	Salazar et al., 06

1.2.2.- POLIMORFISMOS DE BRCA2

Hemos encontrado en total 34 variantes neutrales en BRCA2. En concreto, 11 mutaciones silenciosas, 9 cambios de aminoácido sin importancia clínica y 14 variantes intrónicas. Entre estas variantes encontramos una mutación silenciosa y tres intrónicas de nueva descripción.

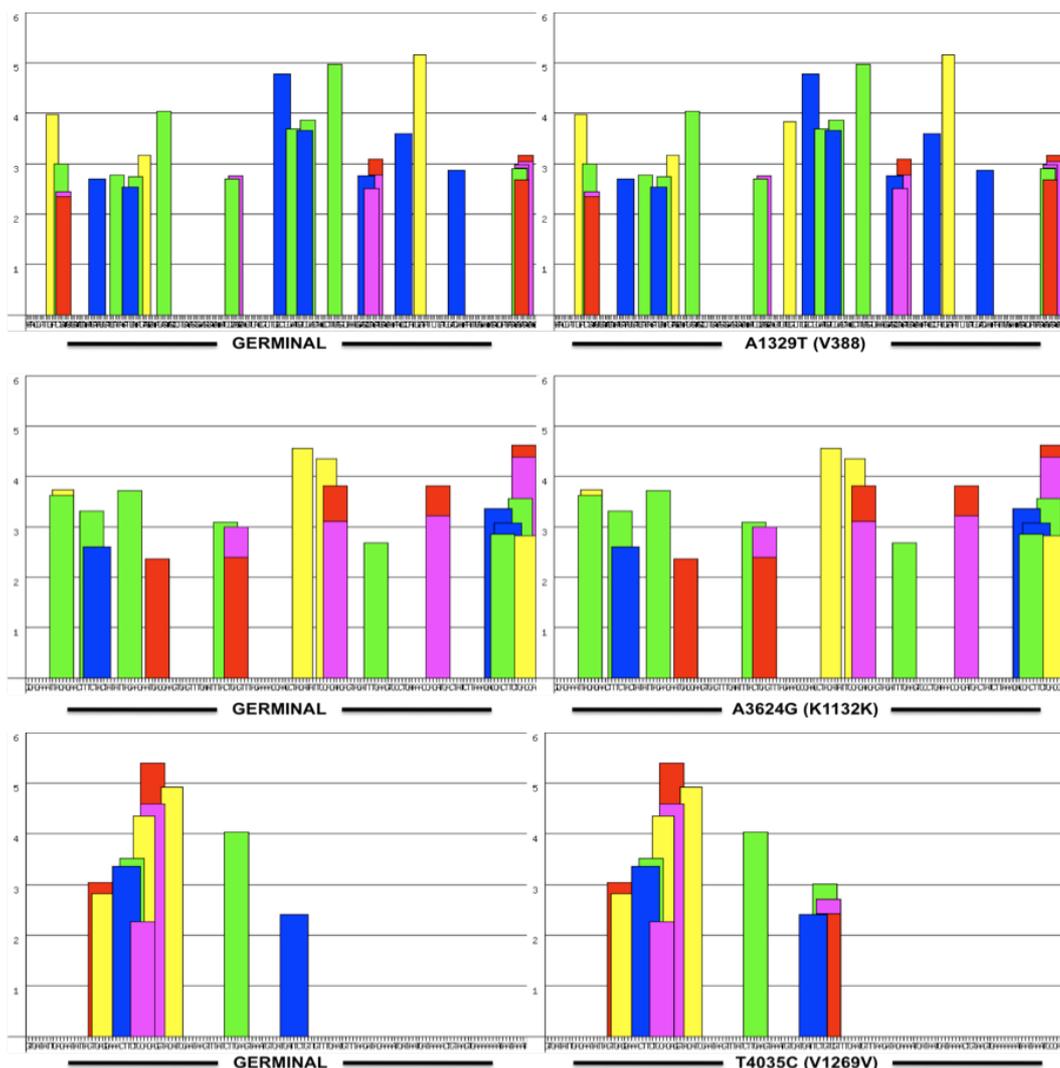
En la tabla 34 se detallan las mutaciones silenciosas encontradas en BRCA2.

Tabla 34: Mutaciones silenciosas sin importancia clínica encontradas en BRCA2

EXÓN	MUTACIÓN DNA	Efecto en la proteína	Pacientes en que aparece	VECES EN BIC	Importancia clínica BIC	Referencias Bibliográficas
10	A1392T	V388V	1	No está	No registrada	No descrita previamente
10	A1593G	S455S	22	7	Neutral	Diez et al., 03 Hadjisavvas et al., 03 Infante et al., 06 Agalliu et al., 07 Konstantopoulou et al., 08 Toh et al., 08
11	T2457C	H743H	4	7	Desconocida	Wagner et al., 99 Diez et al., 03 Edwards et al., 03 Kim et al., 06 Song et al., 06 Agalliu et al., 07 Konstantopoulou et al., 08 Toh et al., 08
11	G3111A	Q961Q	3	4	Desconocida	Wagner et al., 99 Intante et al., 06
11	A3624G	K1132K	1	8	Neutral	Hadjisavvas et al., 03 Hu et al., 03 Kim et al., 06 Infante et al., 06 Han et al., 06 Agalliu et al., 07 Nanda et al., 08
11	T4035C	V1269V	10	3	Neutral	Hu et al., 04 Hadjisavvas et al., 03 Kim et al., 06 Infante et al., 06 Agalliu et al., 07 Toh et al., 08 Nanda et al., 05
11	G4296A	L1356L	3	3	Desconocida	Haffty et al., 06 Infante et al., 06 Beristain et al., 07

11	C4812T	S1528S	1	2	Desconocida	Diez et al., 03
11	C4527T	S1733S	1	2	Neutral	Wagner et al., 99
14	A7470G	S2414S	96	10	Neutral	Hadjisavvas et al., 03 Hu et al., 03 Kim et al., 06 Agalliu et al., 07 Akbari et al., 08 Konstantopoulou et al., 08 Toh et al., 08
16	G7854A	T2542T	2	No está	No registrada	Salazar et al., 06

Para algunas de estas mutaciones silenciosas, al igual que para algunas de BRCA1, existe menos información, lo que aún hace dudar de su neutralidad. Por ello, para aportar algún dato más también realizamos el estudio de los potenciadores de la maduración del RNA con el programa "ESEfinder". Escogimos A1392T (V388V), A3624G (K1132K), T4035C (V1269V), G4296A (L1356L), C4812T (S1528S), y G7854A (T2542).



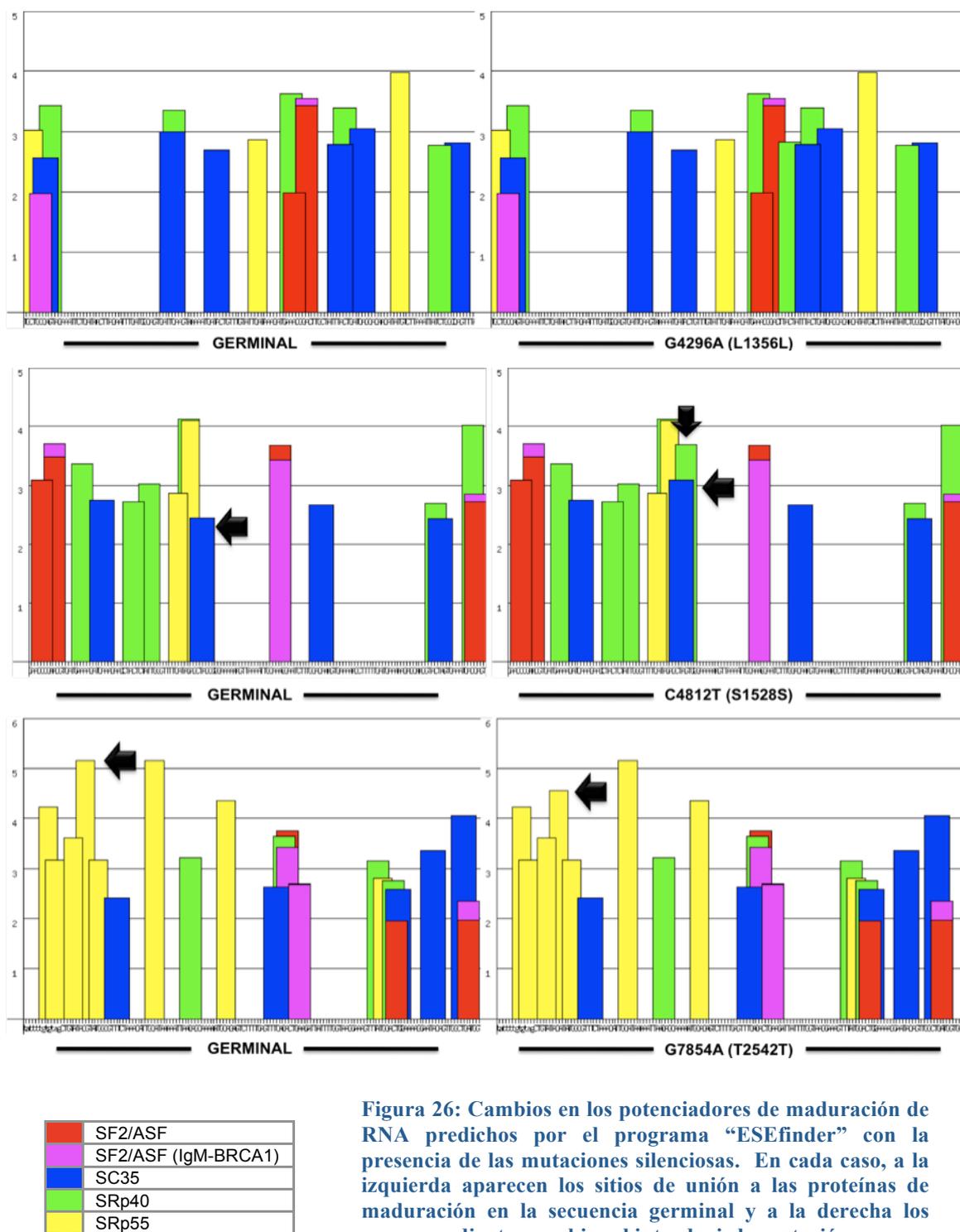


Figura 26: Cambios en los potenciadores de maduración de RNA predichos por el programa “ESEfinder” con la presencia de las mutaciones silenciosas. En cada caso, a la izquierda aparecen los sitios de unión a las proteínas de maduración en la secuencia germinal y a la derecha los correspondientes cambios al introducir la mutación.

Estos resultados predichos por el programa “ESEfinder” son solamente orientativos. Tan solo la comprobación mediante RT-PCR podría confirmar el cambio en la maduración del RNA.

En la tabla 35 se recogen las variantes polimórficas de cambio de aminoácido encontradas en BRCA2.

Tabla 35: Polimorfismos de cambio de aminoácido encontrados en BRCA2

EXÓN	Mutación DNA	Efecto en la proteína	Pacientes en que aparece	VECES EN BIC	Importancia clínica BIC	Referencias Bibliográficas
10	A1093C	N289H	31	13	Neutral	Hadjisavvas et al., 03 Sigurdson et al., 04 Suter et al., 04 Kawahara et al., 04 Han et al., 06 Kim et al., 06 Agalliu et al., 07 Tommasi et al., 08
10	C1342A	N372H	48	9	Neutral	Healey et al., 00 Goode et al., 02 Spurdle et al., 02 Hu et al., 03 Sigurdson et al., 04 Teare et al., 04 Menzel et al., 04 Hughes et al., 05 Cox et al., 05 Wu et al., 05 García-closas et al., 06 BCAC 06 Tommasi et al., 08
10	C1379T	S384F	2	9	Neutral	Diez et al., 03 Manguoglu et al., 03 Weitzel et al., 05 Wappenschmidt et al., 05 Salazar et al., 06 Chenevix-Trench et al., 06
11	G3031A	D935N	1	105	Neutral	Wagner et al., 1999 Edwards et al., 2003 Salazar et al., 2006 Infante et al., 2006 Rajasekaran et al., 2008
11	A3199G	N991D	38	6	Neutral	Hadjisavvas et al., 03 Kim et al., 06 Infante et al., 06 Agalliu et al., 07 Cho et al., 08 Debniak et al., 08
11	G4813A	G1529R	1	74	Neutral	Chen et al., 99 Xia et al., 01 Fries et al., 02 Zhou et al., 05 Pal et al., 05 Weitzel et al., 05 Esashi et al., 07
20	T8731C	S2835P	2	34	Neutral	Malone et al., 00 Pal et al., 05

						Karchin et al., 08
20	A8795C	E2856A	2	185	Neutral	Malone et al., 00 Meindl A., German Consortium HBOC, 02 Pal et al., 05 Chenevix-Trench et al., 06 Karchin et al., 08 Kuznetsov et al., 08
22	G9079A	A2951T	5	40	Neutral	Serova-Sinilnikova et al., 97 Bergthorsson et al., 01 Deffenbaugh et al., 02 Saxena et al., 06 Rajasekaran et al., 08

En la tabla 36 se describen los polimorfismos intrónicos encontrados en BRCA2.

Tabla 36: Mutaciones intrónicas encontradas en BRCA2

INTRÓN	Mutación DNA	Pacientes en que aparece	VECES EN BIC	Importancia clínica BIC	Referencias Bibliográficas
5' UTR	IVS1-26G>A (190-26G>A)	29%	No está	No registrada	Song et al., 06
1	IVS2-7delT (296-7delT)	1	4	Desconocida	Koul et al., 99 Santarosa et al., 99 (a) Couch et al., 07 Diez et al., 07
1	IVS2-60C>T (296-60C>T)	15	No está	No registrada	No descrita previamente
6	IVS6+14C>T (744+14C>T)	2	No está	No registrada	Torres et al., 07
6	IVS6+54T>C (744+54T>C)	1	No está	No registrada	No descrita previamente
8	IVS8+56C>T (909+56C>T)	13%	1	Desconocida	Hadjisavvas et al., 03 Seo et al., 04 Kawahara et al., 04 Saxena et al., 06 Konstantopoulou et al., 08
10	IVS10+12delT (2137+12delT)	17	2	Desconocida	Hadjisavvas et al., 03 Diez et al., 03
10	IVS11-20T>A (7070-20T>A)	1	5	Desconocida	No hay publicaciones
14	IVS14+53C>T (7663+53C>T)	15	4	Neutral	Wagner et al., 99 Scott et al., 02 Hadjisavvas et al., 03 Kanaan et al., 03 Suter et al., 04 Song et al., 06 Tommasi et al., 08

15	IVS16-14T>C (8034-14T>C)	13%	15	Neutral	Yassaee et al., 02 Hadjisavvas et al., 03 Seo et al., 04 Kawahara et al., 04
23	IVS24-16T>C (9485-16T>C)	8	6	Desconocida	Claes et al., 03 Hadjisavvas et al., 03 Edwards et al., 03
24	IVS25-12T>G (9730-12T>G)	1	2	Neutral	Vehmanen et al., 97
25	IVS25+9A>C (9729+9A>C)	1	17	Desconocida	Claes et al., 03 Campos et al., 03 Diez et al., 03
25	IVS25+166G>A (9729+166G>A)	1	No está	No registrada	No descrita previamente

1.3 VARIANTES SIN CLASIFICAR (UVs)

Tanto en BRCA1 como en BRCA2 hemos encontrado variantes que cambian el aminoácido y cuyo significado funcional aún se desconoce.

Se han desarrollado diversas aproximaciones teóricas para su clasificación, pero ninguna de ellas resulta fiable al 100%. Solamente estudios funcionales adecuados podrían juzgar la pérdida o ganancia de función debida a estas alteraciones. Se han publicado diversos trabajos en que comprueban mediante ensayos funcionales las consecuencias de algunas de estas mutaciones, pero suelen ser estudios largos y costosos, por lo que no hay demasiados. Recientemente se han publicado un par de trabajos en que desarrollan un ensayo funcional relativamente sencillo para la comprobación de variantes en BRCA1. Estas aproximaciones, a la larga, pueden ayudar a resolver el problema de los resultados no concluyentes debidos a variantes sin clasificar en el diagnóstico genético.

1.3.1 VARIANTES SIN CLASIFICAR DE BRCA1

En el gen BRCA1 hemos encontrado 16 variantes de significado desconocido. En la tabla siguiente se detallan sus características.

Tabla 37: Variantes de significado desconocido encontradas en BRCA1

Exón	mutación DNA	Efecto en la proteína	Pacientes en que aparece	Veces en BIC	Importancia clínica BIC	Referencias bibliográficas
11	C811T	T231M	1	2	Desconocida	Judkins et al., 05 (a)
11	A1767C	N550H	1	54	Desconocida	El-Harith et al., 02 Judkins et al., 05 (a y b) Augello et al., 06 Tavtigian et al., 06 Caligo et al., 08
11	C2121T	L668F	2	25	desconocida	Eng et al., 01 Vega et al., 02 Diez et al., 03 Infante et al., 06
11	T2431C	L771S	1	No está	No registrada	No hay publicaciones
11	C2640T	R841W	2	114	desconocida	Barker et al., 96 Durocher et al., 96 Petersen et al., 98 Dong et al., 98 Fleming et al., 03 Goldgar et al., 04 Chenevix-Trench et al., 06 Troudi et al., 07 Distelman-Menachem et al., 08
11	C2781T	H888Y	1	2	desconocida	Meyer et al., 03 Judkins et al., 05 (a) Miramar et al., 08
11	G3143A	M1008I	1	138	desconocida	Durocher et al., 96 Frank et al., 02 Abkevich et al., 04 Judkins et al., 05 (a y b) Tavtigian et al., 06 Distelman-Menachem et al., 08
11	G3238A	S1040N	1	45	desconocida	Durocher et al., 96 De la Hoya et al., 99 Ye et al., 01 Bergthorsson et al., 01 Arnold et al., 02 Zuhlke et al., 04 Ward et al., 05 Infante et al., 06 Tavtigian et al., 06 Musolino et al., 07
11	A3474T	T1119S	2	2	Desconocida	Judkins et al., 05 (a)
11	A3537G	S1140G	2	28	desconocida	Panguluri et al., 99 Gao et al., 00 Ellis et al., 00 Infante et al., 06 Tavtigian et al., 06 Konstantopoulou et al.,

						08
11	G3720A	G1201S	1	3	desconocida	Salazar et al., 03
11	A3942G	I1275V	1	13	desconocida	Abkevich et al., 04 Judkins et al., 05 (a)
11	A4158G	R1347G	1	154	Desconocida	Durocher et al., 96 Ye et al., 01 Bergthorsson et al., 01 Deffenbaugh et al., 02 Salazar et al., 03 Zuhlke et al., 04 Simard et al., 07
12	G4251A	V1378I	1	3	Desconocida	Abkevich et al., 04 Peixoto et al., 06
13	C4380T	H1421Y	1	4	Desconocida	Hu et al., 02 Phelan et al., 05
16	G5075A	M1652I	6	39	Desconocida	Schoumacher et al., 01 Deffenbaugh et al., 02 Arnold et al., 02 Tommasi et al., 05 Saxena et al., 06 Gough et al., 07

1.3.2 VARIANTES SIN CLASIFICAR DE BRCA2

En el gen BRCA2 hemos encontrado 15 variantes de significado desconocido. En la tabla siguiente se detallan las características de las mismas.

Tabla 38: Variantes sin clasificar encontradas en BRCA2

Exón	mutación DNA	Efecto en la proteína	Pacientes en que aparece	Veces en BIC	Importancia clínica BIC	Referencias Bibliográficas
3	A353G	Y42C	1	141	Desconocida	Milner et al., 97 Fuks et al., 98 Wong et al., 03 Edwards et al., 03 Goldgar et al., 04 Wu et al., 05 Chenevix-Trench et al., 06 Kim et al., 06 Salazar et al., 06 Simard et al., 07 Kuznetsov et al., 08
3	A407G	N60S	1	4	Desconocida	Baeyens et al., 04
5	A677G	H150R	1	No está	No está	Salazar et al., 06
10	C1351T	P375S	3	6	Desconocida	Salazar et al., 06
10	A1505C	K426T	1	No está	No está	No hay publicaciones

10	C1600A	P458T	1	No está	No está	No hay publicaciones
11	A3226C	I1000L	1	No está	No está	No hay publicaciones
11	A5957T	N1910I	1	No está	No está	Beristain et al., 07
11	C5972T	T1915M	20	7	Desconocida	Shih et al., 00 Basham et al., 01 Goode et al., 02 Sigurdson et al., 04 Kim et al., 06 Infante et al., 06 Johnson et al., 07 Agalliu et al., 07 Debniak et al., 08
11	C6328T	R2034C	2	97	Desconocida	Wagner et al., 99 Healey et al., 00 Deffenbaugh et al., 02 Goode et al., 02 Hahn et al., 03 Salazar et al., 06 Infante et al., 06 Simard et al., 07 Johnson et al., 07 Miramar et al., 08
14	C7625T	A2466V	1	48	Desconocida	Wagner et al., 99 Gao et al., 01 Diez et al., 03 Hadjisavvas et al., 03 Freedman et al., 04 Nanda et al., 05 Infante et al., 06
20	A8746G	I2840V	2	1	Desconocida	Salazar et al., 06 Peixoto et al., 06
22	G9121C	D2965H	1	2	Desconocida	No hay publicaciones
25	T9520C	Y3098H	1	30	Desconocida	Gayther et al., 99 Edwards et al., 03 Karchin et al., 08 Miramar et al., 08
27	A10462G	I3412V	9	110	Desconocida	Inoue et al., 97 Vehmanen et al., 97 Bergthorsson et al., 01 Malandar et al., 04 Seo et al., 04 Hu et al., 04 Freedman et al., 04 Suter et al., 04 Warlam et al., 05 Kim et al., 06 Infante et al., 06

2.- ESTUDIO PORMENORIZADO DE ALGUNAS VARIANTES SIN CLASIFICAR

2.1.- RASTREO DE LAS VARIANTES EN LA POBLACIÓN GENERAL

Hemos escogido determinadas mutaciones de BRCA2 designadas como “UV” (“unclassified variant”) en el BIC (“Breast Cancer Information Core”). Algunas de estas mutaciones aparecieron en nuestra serie de pacientes, mientras que otras habían sido detectadas previamente en nuestro laboratorio durante el diagnóstico genético.

Nuestro primer intento de clasificación consistió en examinar la presencia de dichas variantes en 100 individuos control de la población general. Para ello se seleccionaron 100 individuos sanos que nunca han desarrollado ningún tipo de cáncer, de todas las edades y ambos sexos, como grupo control. Previo consentimiento, se procedió a la extracción de sangre periférica de cada individuo por venopunción, a partir de la cual se aisló el DNA genómico por procedimientos estándar.

Las muestras de DNA fueron amplificadas mediante PCR a través de cebadores que flanqueaban la zona de interés (los exones portadores de cada variante). Para la identificación de las variantes se emplearon distintas técnicas:

- CSGE (“conformation sensitive gel electrophoresis”). Esta técnica fue la empleada para las mutaciones G1201S de BRCA1, y H150R, D244N, P357S, W395G, D935N, K1057R, A2717S, I2840V de BRCA2.

- Nucleasas de restricción: Esta técnica fue la empleada para las mutaciones R2034C y A2717S. Los nucleótidos que cambian se encuentran en la zona de reconocimiento de una nucleasa, en este caso de SnaBI y CfrI.

- dHPLC (“denaturing high performance liquid chromatography”). Esta técnica se utilizó para las mutaciones E3002K y K3326X.

Tres de las variantes aparecieron en nuestra población control, lo cual indica que probablemente se trate de polimorfismos benignos (Arnold et al., 2002; Deffenbaugh et al., 2002).

En la tabla siguiente se resumen las mutaciones estudiadas y su frecuencia en controles sanos.

Tabla 39: Resultados del rastreo de mutaciones en la población control.

EXÓN	Mutación DNA	Efecto en la proteína	Frecuencia del alelo menos frecuente
5	G677A	H150R	0/100
9	G958A	D244N	0/100
10	C1351T	P375S	0/100
10	C1379T	S384F	0/100
10	T1411G	W395G	0/100
11	G3031A	D935N	1 / 100
11	A3398G	K1057R	0/100
11	C6328T	R2034C	4 / 100
18	G8377T	A2717S	0/100
20	A8746G	I2840V	0/100
23	G9232A	E3002K	0/100
27	A10204T	K3326X	2 / 100

La búsqueda de la variante D935N de BRCA2 se llevó a cabo mediante CSGE, ya que esta mutación apareció por primera vez en dos pacientes de cáncer de mama hereditario (pacientes número 6497 y 8879) como una banda doble fácilmente reconocible que fue confirmada por secuenciación automática. Ambos individuos resultaron ser heterocigotos para la alteración.

Siguiendo el mismo sistema de detección, al analizar 100 controles sanos encontramos la variante en un individuo de la población escrutada (control número 6352), el cual también resultó ser heterocigoto. Por lo tanto, la variante D935N apareció en el 1% de la población control escrutada.

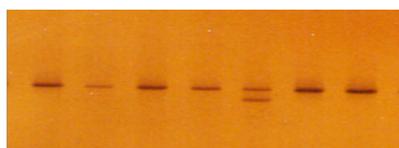
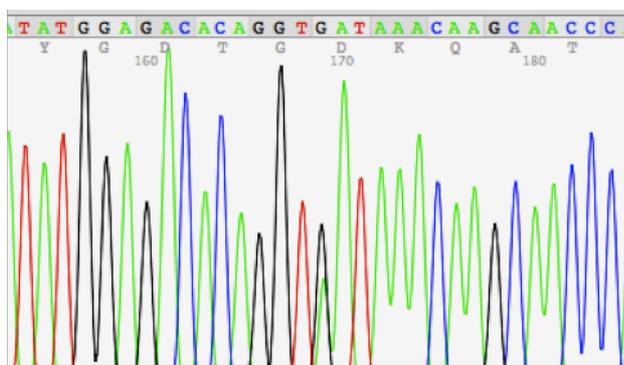


Figura 27: A la izquierda, en el quinto carril, patrón de migración alterado en CSGE del paciente con la variante G3031A (D935N); el resto de carriles son muestras de individuos control. A la derecha, cromatograma de la secuencia que incluye dicha variante.



La variante R2034C apareció por primera vez en el paciente 4587 (heterocigoto) y su detección por CSGE resultaba ser problemática. Por ello decidimos hacer el escrutinio de los controles aprovechando que la alteración se encuentra en la zona de reconocimiento de la nucleasa de restricción *Sna*BI. En nuestro caso utilizamos un isoesquizómero de la misma (*Eco*105I).

Esta enzima reconoce la secuencia TAC/GTA. En este caso, el cambio de nucleótido es C por T, de forma que la enzima corta el alelo germinal, pero no el mutado. Así las cosas obtendríamos según el genotipo de la muestra distintos patrones de bandas:

- Homocigoto TT: Fragmento único de 468 p.b.
- Heterocigoto CT: Tres fragmentos de 468 pb, 417 pb y 51 pb.
- Homocigoto CC: Dos fragmentos de 417 pb y 51 pb.

En caso de obtener un patrón de corte que sugiriera la presencia del alelo T, procedimos a la secuenciación automática para confirmar la presencia de la mutación.

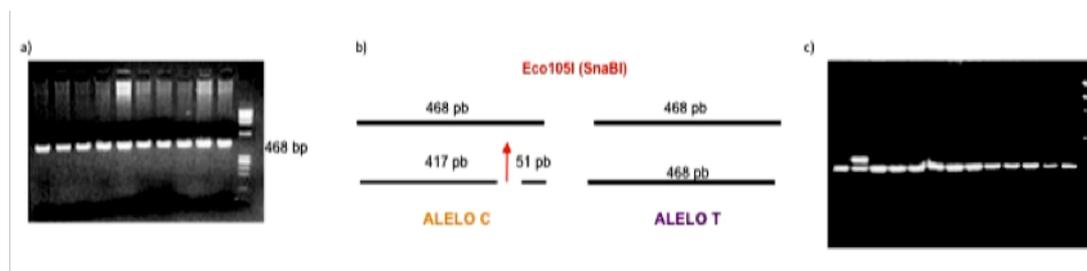


Figura 28: Esquema detección R2034C. a) PCR fragmento exón 11 que contiene la mutación. b) Esquema de corte *Sna*BI. c) En el carril 2 hay una muestra heterocigota, el resto son homocigotos germinales.

La mutación R2034C apareció en 4 de los 100 controles analizados, en todos ellos de forma heterocigota. Esto representa un 4% de la población estudiada, lo que significa que esta variante es bastante común en la población general.

La variante G8377T (A2717S) también fue detectada mediante nucleasas de restricción, en este caso con la enzima *Cfr*I (isoesquizómero de *Eae*I). Esta enzima reconoce la secuencia pyrGGCCpu/puCCGGpyr. En este caso el cambio de nucleótido es G por T, de

forma que la enzima corta el alelo germinal pero no el mutado. De este modo obtendríamos según el genotipo de la muestra distintos patrones de bandas:

- Homocigoto GG: Fragmentos de 267 pb y 233 pb.
- Heterocigoto GT: La enzima reconoce el alelo G y no el T, generando fragmentos de 500pb, 267 pb y 233 pb.
- Homocigoto TT: La enzima no reconoce ninguno de los dos alelos y se obtiene el fragmento sin cortar de 500 pb.

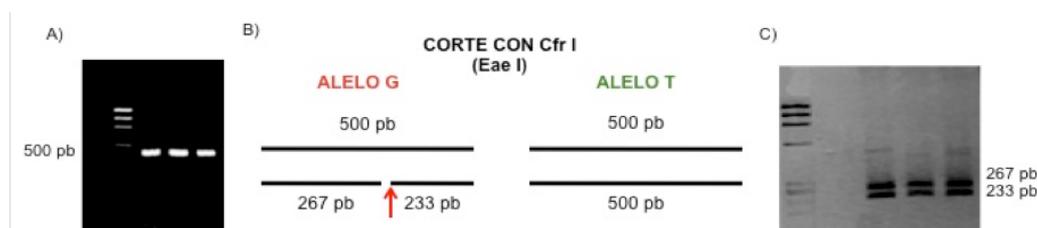


Figura 29: a) Productos de PCR del exón 18 de BRCA2, b) Esquema del patrón de corte de CfrI, c) Fragmentos obtenidos de la digestión. Todos los individuos son homocigotos GG. El primer carril en a) y c) es el marcador de peso molecular.

Todos los controles analizados resultaron ser homocigotos germinales para G8377T.

La alteración K3326X es un caso curioso, ya que a pesar de ser una mutación que provoca un codón de parada prematuro, al estar en el último exón del gen el fragmento que se pierde no parece tener relevancia funcional y la proteína puede seguir actuando normalmente.

El rastreo en busca de esta mutación se efectuó mediante dHPLC (cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante). Los homocigotos para el alelo germinal daban lugar a un pico único de elución, mientras que los heterocigotos producían un pico doble.

De esta forma encontramos la alteración en 2 individuos de los 100 analizados, lo que supone un 2% de representación en nuestra población control.

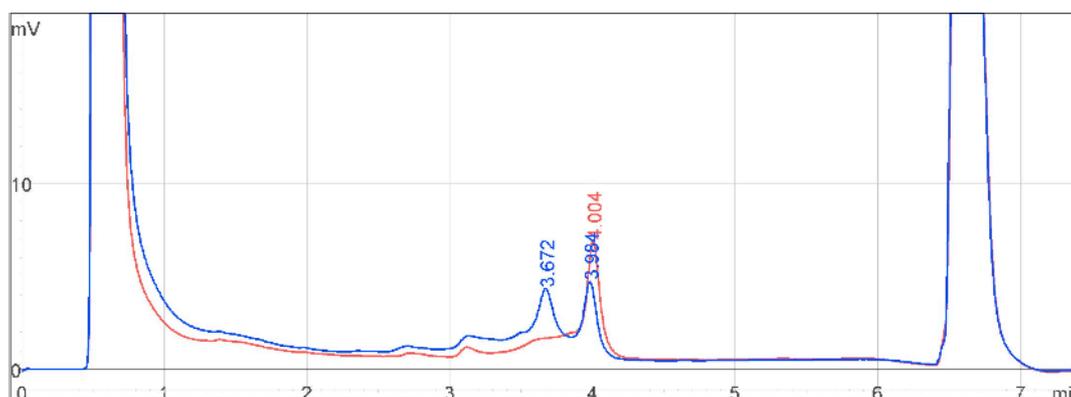


Figura 30: Cromatograma de resultados dHPLC. La línea azul corresponde a un individuo heterocigoto para la mutación K3326X, y la roja a un individuo homocigoto germinal.

2.2.- SITUACIÓN DENTRO DE LA PROTEÍNA Y TIPO DE CAMBIO DE AMINOÁCIDO.

A la hora de clasificar una alteración es importante saber si se encuentra dentro de un dominio funcional importante de la enzima o por el contrario en una zona que “conecta” unos dominios con otros. Las alteraciones en el sitio activo, zonas de unión a proteínas o DNA...etc., suelen alterar las funciones de la proteína y su actividad.

De las variantes estudiadas, sólo algunas se encontraban en dominios importantes de BRCA1 y BRCA2.

Por otra parte, también es importante el tipo de cambio de aminoácido que se produce, ya que la carga y forma de los mismos pueden alterar la estructura tridimensional de la proteína. Estos datos se resumen en las tablas siguientes.

Tabla 40: Tipo de cambio de aminoácido para cada variante y dominio funcional en que se encuentran algunas de ellas.

MUTACIÓN	TIPO DE CAMBIO DE AMINOÁCIDO		MUTACIÓN	DOMINIO FUNCIONAL
H150R	H carga positiva	R carga positiva	P357S	Sitio de unión a P/CAF
D244N	D carga negativa	N polar sin carga	S384F	Sitio de unión a P/CAF
P357S	P hidrofóbico	S polar sin carga	W395G	Sitio de unión a P/CAF
S384F	S polar sin carga	F hidrofóbico	D935N	Sitio de unión a RAD51
W395G	W hidrofóbico	G polar sin carga	K1057R	Sitio de unión a RAD51
D935N	D carga negativa	N polar sin carga	A2717S	Sitio de unión a DSS1
K1057R	K carga positiva	R carga positiva	I2840V	Sitio de unión a DSS1
R2034C	R carga positiva	C polar sin carga	K3326X	Zona DBD junto al NLS
A2717S	A hidrofóbico	S polar sin carga		
I2840V	I hidrofóbico	V hidrofóbico		
E3002K	E carga negativa	K carga positiva		

2.3.- CONSERVACIÓN ENTRE ESPECIES

El análisis de la conservación evolutiva a través de alineamientos múltiples de proteínas permite comparar las secuencias de los homólogos en diversas especies y saber qué residuos se encuentran más o menos conservados entre ellas. Las variantes localizadas en residuos muy conservados son más a menudo patogénicas que aquellas que suceden en posiciones menos conservadas. Por tanto, un residuo que es capaz de cambiar a través de la evolución y aún así permite la aparición de una proteína funcional, será más fácilmente adaptable ante una mutación. Mientras que un residuo que ha permanecido inamovible a través de las especies tiene más posibilidades de ser importante para la actividad de la proteína y si cambia puede dar lugar a una proteína no funcional.

Para comprobar el grado de conservación de los residuos donde se localizan las variantes en estudio, realizamos un alineamiento múltiple de secuencias mediante el programa CLUSTALW. Utilizamos para ello los homólogos de BRCA2 en macaco rhesus, mono verde, perro, gato, ratón, rata y gallo.

Los resultados del alineamiento se resumen en la tabla 41.

Tabla 41: Conservación entre especies de los residuos donde se localizan las variantes sin clasificar en estudio.

Especie	VARIANTES SIN CLASIFICAR EN ESTUDIO										
	H150R	D244N	P375S	S384F	W395G	D935N	K1057R	R2034C	A2717S	I2840V	E3002K
Humano	H	D	P	S	W	D	K	R	A	I	E
Macaco rhesus *	H	D	P	S	W	D	K	H	A	I	E
Mono verde *	-	-	-	-	-	D	K	H	-	-	-
Perro	H	D	P	S	C	D	K	Y	G	I	E
Gato	H	D	P	S	S	D	E	H	G	I	E
Rata	Q	D	P	S	W	D	K	H	D	I	E
Ratón	Q	D	P	C	W	D	K	H	D	I	E
Gallo	C	D	T	L	W	-	K	E	A	V	E

*Mono verde: *Chlorocebus aethiops*; macaco rhesus: *Macaca mulatta*.

2.4.-- ESTUDIOS “IN SILICO”

Caracterizar experimentalmente todas las variantes de cambio de aminoácido sería un proceso caro, largo y difícil. Existen métodos informáticos que permiten predecir si un cambio de aminoácido afecta a la función de la proteína. Las sustituciones que afectan a la función de la proteína se asume que son causantes de enfermedad.

Estos algoritmos se basan en que las mutaciones causantes de enfermedad suelen aparecer en zonas conservadas a través de la evolución y suelen estar ocultas en la parte interna de la proteína.

Para hacer una predicción, estos programas pueden servirse de la secuencia, la estructura, y de datos extra sobre función de la proteína. En el primer caso, se introduce una secuencia y el programa hace una búsqueda de una base de datos para encontrar secuencias homólogas. Un alineamiento múltiple revela los residuos conservados a través de la evolución, los cuales se presupone son importantes para la función de la proteína y determina el grado de tolerabilidad del cambio. Si este cambio es por un aminoácido que no aparece en ninguna de las secuencias del alineamiento y tiene unas propiedades fisicoquímicas distintas al anterior, será considerado patogénico.

Los métodos basados en la estructura toman la secuencia y buscan una estructura proteica con la que coincida en una base de datos. Pueden extrapolar el cambio en la estructura de una proteína homóloga. Teniendo en cuenta diversos parámetros determinan si el cambio es neutral o patogénico.

Además, algunos programas incorporan datos sobre si el aminoácido está en el sitio activo de la proteína, o está implicado en unión a un ligando, es parte de un puente disulfuro, o está relacionado con interacciones proteína-proteína.

Hemos utilizado cuatro de estos programas de predicción para ver qué tipo de cambio originan las mutaciones en estudio, esto es, si se trata de un polimorfismo neutral o de una variante patogénica. En cualquier caso, siempre se tratará de una aproximación, la caracterización final debe hacerse siempre mediante análisis más exhaustivos.

En la tabla 42 se detallan las predicciones obtenidas con los distintos programas informáticos.

Tabla 42: Predicciones sobre las consecuencias de las mutaciones en estudio .Cada programa usa un baremo distinto, esto es: en polyphen las puntuaciones van de 0 a un número positivo, donde 0 es neutral y el número cuanto más alto, más patógena. En SIFT van de 0 a 1, donde 0 es patógena y 1 neutral. En SNPS3D una puntuación menor de 0 es patógena, mayor neutral. En pMUT van de 0 a 1, donde 0 es neutral y hacia el 1 patógena.

Variante	POLYPHEN		SIFT		SNPs3d		pMUT	
	Puntuación	Predicción	Puntuación	Predicción	Puntuación	Predicción	Puntuación	Predicción
H150R	2,133	Patógena	0,23	Neutral	No es capaz de realizar una predicción para estas variantes		0,3648	Neutral
D244N	1,614	Posiblemente patógena	0,00	Patógena			0,3535	Neutral
S384F	1,920	Posiblemente patógena	0,04	Patógena			0,8832	Patógena
P375S	2,274	Patógena	0,00	Patógena			0,2426	Neutral
W395G	2,949	Patógena	0,55	Neutral			0,7466	Patógena
D935N	1,614	Posiblemente patógena	0,00	Patógena	-0,17	Patógena	0,3190	Neutral
K1057R	1,307	Neutral	0,10	Neutral	2,24	Neutral	0,0314	Neutral
R2034C	0,423	Neutral	0,04	Patógena	-0,52	Patógena	0,9215	Patógena
A2717S	0,736	Neutral	0,82	Neutral	1,45	Neutral	0,0596	Neutral
I2840V	0,960	Neutral	0,00	Patógena	1,27	Neutral	0,1061	Neutral
E3002K	1,470	Neutral	0,00	Patógena	-1	Patógena	0,6100	Patógena

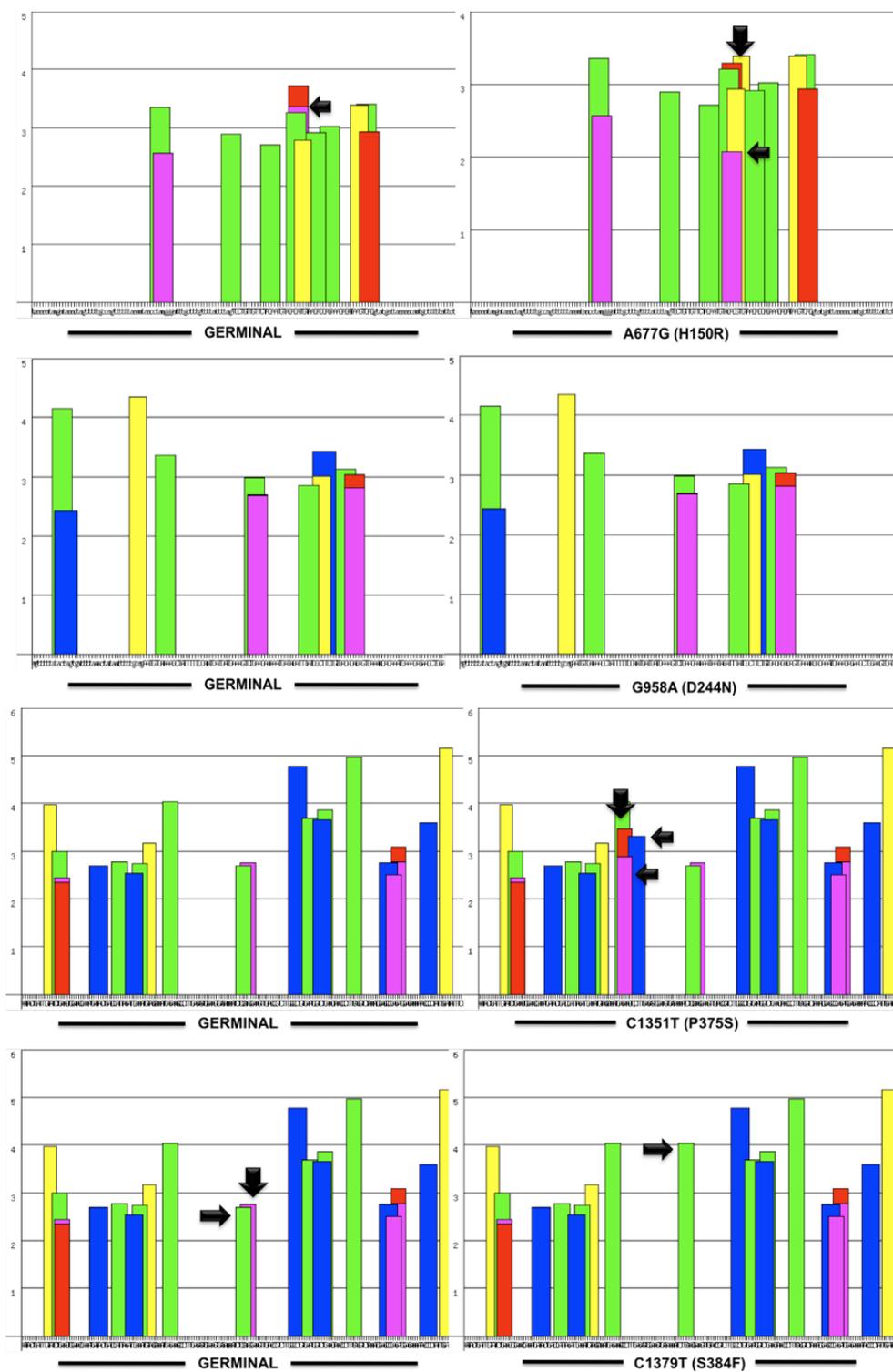
2.5.- ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO DE mRNA

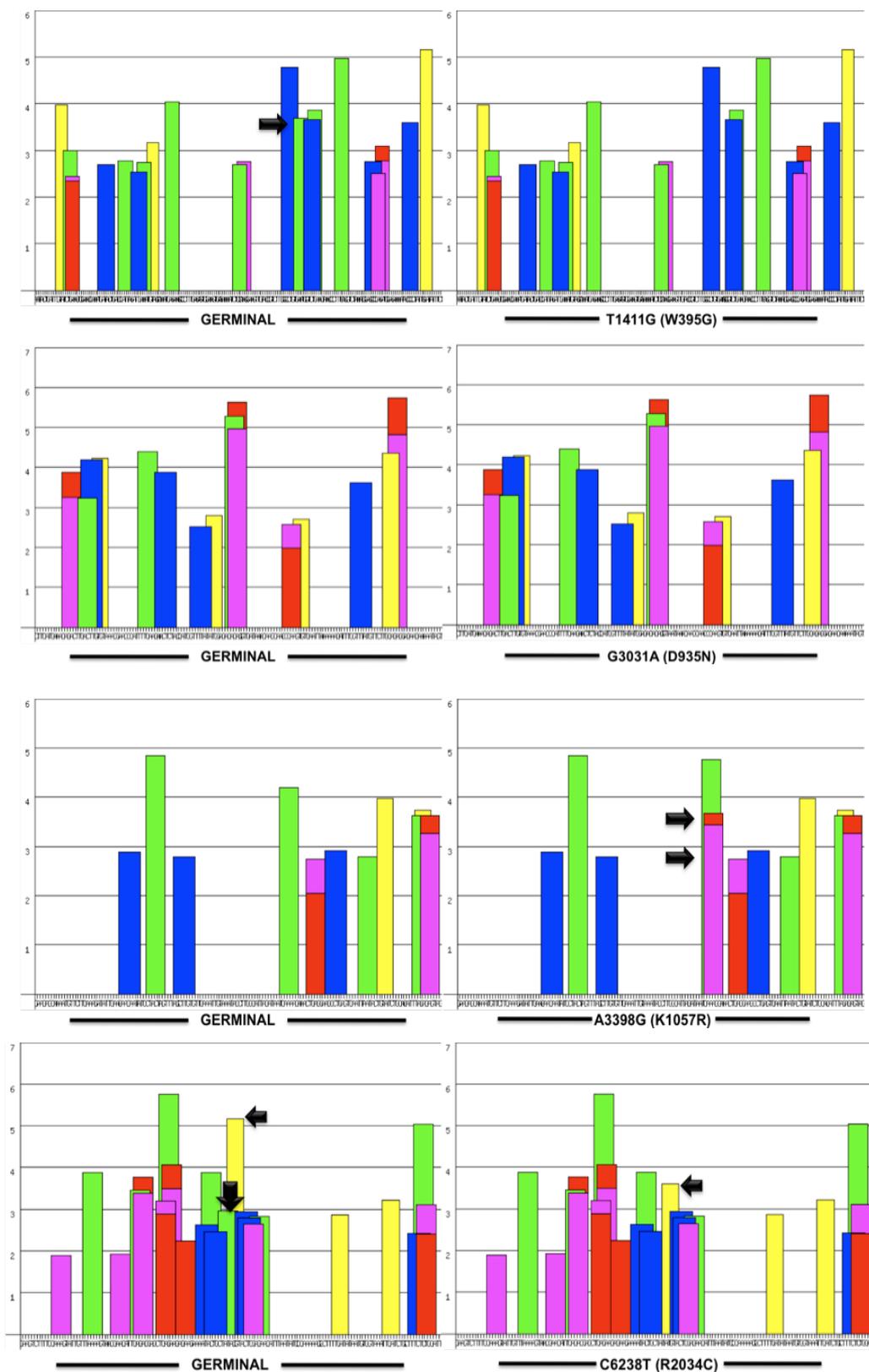
Dentro de un gen, además de las secuencias canónicas de procesamiento del MRNA existen secuencias dentro de los exones que potencian el procesamiento mediante su unión a proteínas que controlan el proceso. El programa “online” ESEfinder 2.0 se encarga de buscar esas secuencias que actúan como sitios de unión para las proteínas potenciadoras de “splicing” ricas en Ser/Arg (proteínas SR). El programa busca zonas de unión para cuatro de estas proteínas: SF2/ASF, SC35, SRp40, y SRp55. El programa busca secuencias consenso dentro del gen, y los valores por encima de un umbral marcado por defecto actuarían como sitios de unión a las proteínas SR y por tanto funcionarían como “ESEs”.

Los ESEs que predijo el programa para la forma germinal de BRCA1 y BRCA2 fueron comparados con los valores obtenidos con la forma mutada de los genes. De esta

forma se podría identificar cualquier pérdida, ganancia o alteración en los sitios de unión predichos para proteínas SR.

En las figuras siguientes se esquematiza la pérdida o ganancia de sitios ESE, así como los cambios de afinidad de los ya existentes por las proteínas SR.





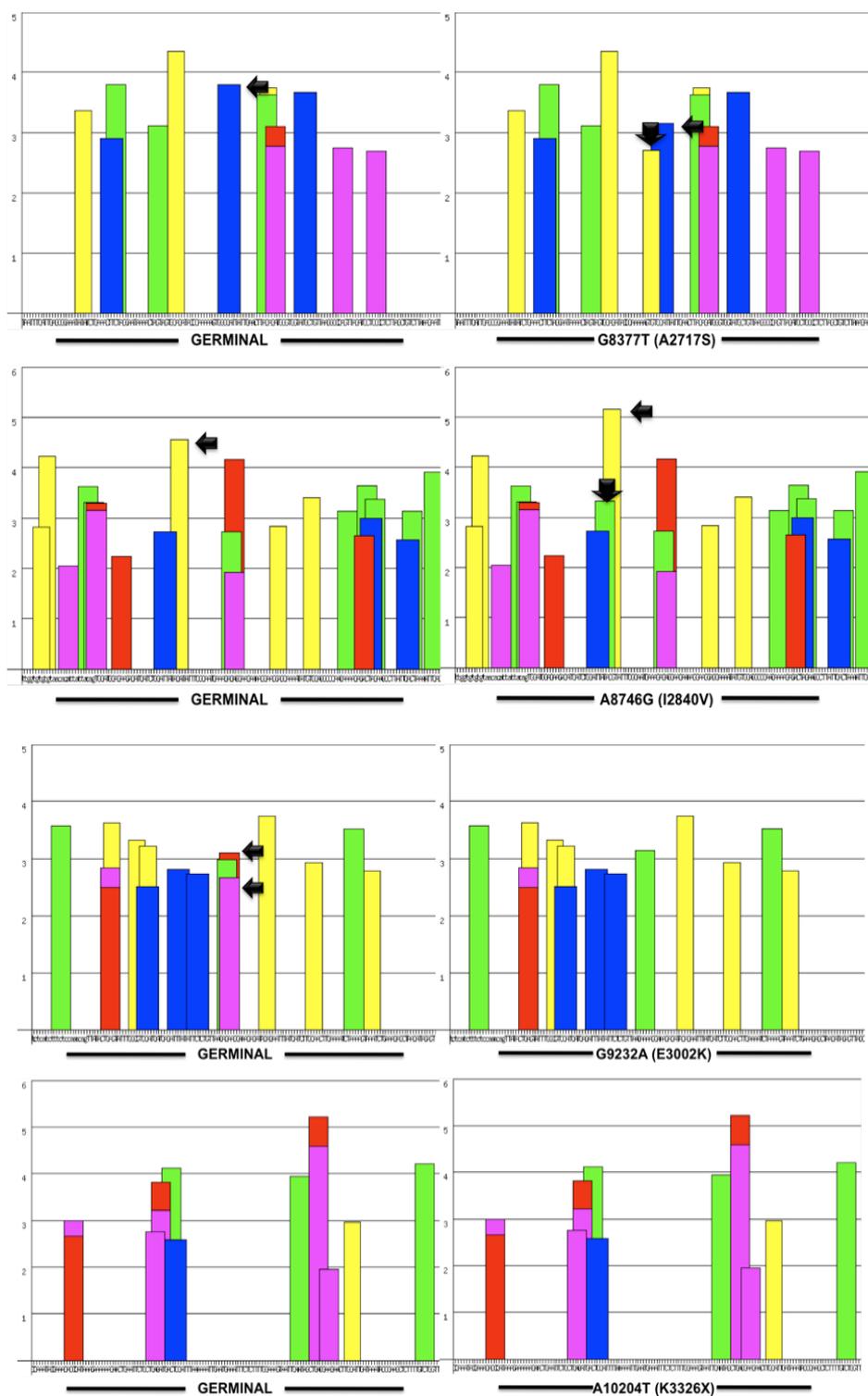


Figura 31: Representación de los resultados de ESEfinder. En cada esquema vemos a la izquierda la unión de proteínas SRP a la secuencia germinal, y a la derecha la unión a la secuencia alterada.

Todas las variantes salvo D244N y K3326X alteran en mayor o menor medida la unión de los potenciadores a las proteínas de maduración. Debido a la posible presencia de falsos positivos estos resultados han de tomarse con cautela, y lo ideal sería la comprobación mediante RT-PCR de la maduración del RNA en la muestra portadora de la mutación.

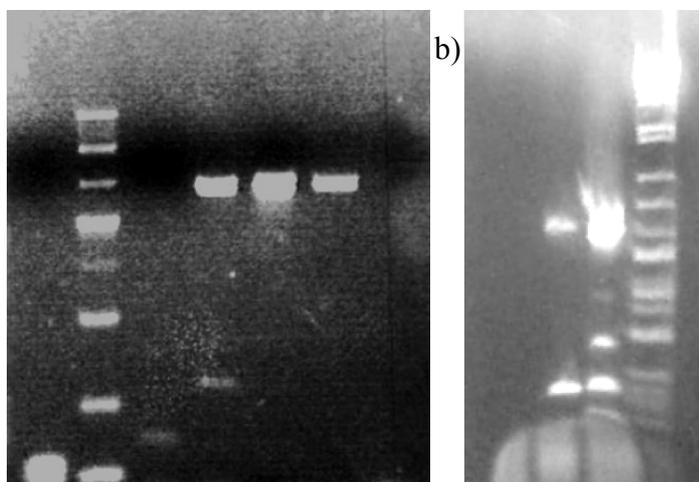
Al carecer de RNA en la mayoría de los casos, sólo nos ha sido posible llevar a cabo esta comprobación en dos de ellos, para la variante H150R y la I2840V ambas de BRCA2.

El procedimiento fue análogo: A partir del RNA de los pacientes en los cuales se detectaron las mutaciones se obtuvo el cDNA por RT-PCR. Después, diseñamos unos cebadores que bordearan el exón en cuestión y amplificamos esa zona mediante PCR del cDNA.

Para la mutación presente en el exón 5 (H150R) diseñamos cebadores sentido y antisentido en el exón 3 y 7 respectivamente y amplificamos el fragmento la región entre ellos. El producto de PCR con maduración normal tiene 480 pb y no apareció ningún fragmento de menor tamaño (de unos 430 pb) indicativo de una posible maduración alternativa con pérdida del exón 5.

Para la mutación presente en el exón 20 (I2840V) diseñamos cebadores sentido y antisentido en el exón 17 y 21 respectivamente. Obtuvimos tras la amplificación un producto de PCR único del tamaño esperado para el germinal (891 pb), no observando ningún fragmento de menor tamaño que correspondiera a una pérdida del exón 20 (746 pb).

Figura 32: a) RT-PCR para comprobar el posible cambio en la maduración del RNA debido a la mutación H150R. El primer carril es el marcador de peso molecular, seguido del control negativo y las muestras de cDNA de los pacientes. No se aprecia ninguna banda por debajo de la germinal que coincida con la pérdida del exón 5. b) RT-PCR de comprobación de la maduración por la variante I2840V (control negativo, muestras de dos pacientes y marcador). Las bandas que se observan por debajo de la germinal fueron secuenciadas y se trataba de amplificaciones inespecíficas, no se encontró maduración alternativa.



De estos resultados se concluye que las aproximaciones informáticas no siempre son precisas y siempre que sea posible deben corroborarse por otros medios.

2.6.- PRESENCIA SIMULTÁNEA DE MUTACIONES PATOGENICAS CON LAS VARIANTES “UV”

BRCA1 y 2 son genes supresores de tumores de gran importancia en la reparación de errores en el DNA y en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se ha descrito la presencia de mutaciones patogénicas heterocigóticas en ambos genes, más las mutaciones bialélicas suelen producir letalidad embrionaria o en el caso de que el embarazo llegue a término la esperanza de vida del portador es muy corta.

Por ello, está comúnmente aceptado que la presencia de una mutación patogénica en una de las copias del gen hace que cualquier otra variante presente en la otra copia sea considerada neutral.

En nuestro caso, tan sólo una de las mutaciones sin clasificar coincide con una mutación patogénica en el mismo paciente: es el caso de I2840V, que aparece simultáneamente junto a la pérdida patogénica 8873delACCA, que da lugar a un codón de parada prematuro y una proteína truncada.

Por lo tanto, la mutación I2840V puede ser considerada un polimorfismo neutral.

2.7.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Procedimos a hacer una revisión de los artículos publicados en los que aparecieran nuestras mutaciones en estudio y tener en cuenta los posibles intentos de clasificación de las mismas. En la tabla 43 se resume el material encontrado al respecto.

Tabla 43: Resumen sobre las publicaciones donde aparecen las variantes estudiadas.

VARIANTE	REFERENCIA	Frecuencia pacientes	Frecuencia controles	País/ origen étnico	Observaciones
D244N	Peixoto et al. 2006	1/100 familias		España (Galicia)	Aparece en una familia con dos casos de cáncer de mama. BRCA _{PRO} =0.74
W395G	Weitzel et al. 2005	1/110 pacientes		Hispano/ caribeño	Encuentran un 23% de variantes sin clasificar.

S384F	Chenevix-Trench et al. 2006				La clasifican como NEUTRAL por medios informáticos.
	Peixoto et a. 2006	1/100 familias		España (Galicia)	Familia con dos casos de cáncer de mama. BRCA _{PRO} =0,14
	Wappenschmidt et al. 2005	3/4 pacientes		Alemania	La variante presenta segregación incompleta, y aparece junto a patogénicas en trans. Por esto y su conservación y tipo de cambio la clasifican como NEUTRAL.
	Weitzel et al. 2005	1/100 pacientes		Ascendencia centroeuropea	
	Manguoglu et al. 2003	1/83 pacientes		Turquía	10% de mutaciones de BRCA en población turca.
	Meindl, German Consortium for HBOC, 2002	1/777 pacientes	0/200 controles >60 años	Alemania	Remarcan la necesidad de aumentar el número de controles por la baja frecuencia de las mutaciones.
D935N	Beetstra et al. 2006	1/15 familias		Australia	Aparece en un individuo afecto y uno sano de la misma familia.
	Velasco et al. 2005	1/187 familias		España (Castilla-león)	Desarrollan una nueva técnica de detección.
	Edwards et al. 2003	1/263 pacientes		Reino Unido	Estudio cáncer de próstata.
	Wagner et al. 1999	1/71 familias	0/95 controles multiétnicos	Familias austríacas y controles de etnias diversas	Heterocigosidad global=0,006. En la familia que la encuentran había dos casos de cáncer de mama a los 48 y 49 años. Son portadores de otra mutación UV y una intrónica.
K1057R	Weber et al. 2006	1/51 pacientes cáncer familiar		Reino Unido	No aparece en pacientes de cáncer esporádico. Postulan que la acumulación de inestabilidad genómica en el estroma del tumor promueve el desarrollo del cáncer.
R2034C	Miramar et al. 2008	1/60 familias		España (Aragón)	Aparece en una familia con dos casos, uno menor de 40 años.
	Frosk et al. 2007	1/86 pacientes		Canadá	Describen distintos haplotipos de variantes de BRCA1 y 2.
	Beristain et al. 2007	5/236 pacientes	1/130 controles	España (País Vasco)	Esta variante podría aumentar ligeramente el riesgo.
	Van der Hout et	1/431		Holanda	0,5% frecuencia del alelo

	al. 2006	familias			menos habitual. La consideran polimorfismo neutral.
	Infante et al.2006	1/309 familias		España (Castilla-león)	La consideran polimorfismo neutral.
	Velasco et al. 2005	4/431 pacientes		España (Castilla-león)	La consideran polimorfismo neutral.
	Díez et al. 2003	1/410 familias		España	Aparece en una familia con 3 casos de cáncer de mama en mayores de 50.
	Hahn et al. 2003	1/26 familias		Alemania	Estudio cáncer de páncreas.
	Sinclair et al. 2002	1/42 pacientes			No hacen alusión a esta mutación.
	Deffenbaugh et al. 2002				Concluyen que es neutral basándose en otros estudios.
	Wagner et al. 1999	1/71 familias	0/95 controles multiétnicos	Familias austríacas y controles de etnias diversas	Aparece en una familia con un cáncer de mama a los 29 años.
A2717S	Karchin et al., 2008				Aproximación matemática. La clasifican como neutral.
	Simard et al., 2007	1/256 familias		Franco-canadienses.	Estudio en un individuo afecto.
	Lubinski et al., 2004	1/440 familias		Canadá, E.E.U.U. y Polonia.	Familias de etnias muy diversas
	Edwards et al. 2003	2/263 pacientes		Reino Unido	Estudio cáncer de próstata.
	Meindl, German Consortium for HBOC, 2002.	1/777 pacientes	0/200 controles	Alemania	Remarcan la necesidad de aumentar el número de controles.
I2840V	Peixoto et al. 2006	1/100 familias		España (Galicia)	Aparece junto a otra UV, I2828V, en una familia con cáncer de mama y ovario.
K3326X	Beristain et al. 2007	1/236 pacientes	2/130 controles	España (País Vasco)	Aparece en un paciente junto a una pérdida patogénica.
Nota: Esta variante ha sido encontrada en multitud de estudios. Sólo hemos citado algunos de ellos.	Martin et al. 2005	8/144	1/135	Estados Unidos	Estudio cáncer de páncreas familiar.
	Hadjisavvas et al. 2004	1/40 familias	1/50	Chipre	Creen que no es deletérea.
	Hadjisavvas et al. 2003	1/26 familias	1/50	Chipre	Aparece en una paciente de 45 años con dos familiares afectados. Como también aparece en controles no pueden concluir nada en firme.
	Claes et al. 2003	8/249	2/100		Siempre está en desequilibrio de ligamiento con IVS24-16T>C. En 3 de 8 familias estaban estas dos mutaciones y una patogénica, por lo que

					asumen que k3326x es un polimorfismo.
	Donoho et al. 2003				Estudio en ratones. Encuentran que la región que se pierde, aunque no es esencial para la viabilidad, es importante para la función de la proteína.

Durante la realización de este trabajo, se profundizó en el estudio de algunas de las variantes, las cuales pasaron a considerarse polimorfismos en el BIC. Sin embargo, para la mayoría, aún faltan datos suficientes para hacer una clasificación veraz, a la espera de que se desarrollen estudios funcionales para comprobar su neutralidad o patogenicidad.

3.- ESTUDIO DE GRANDES REORDENAMIENTOS EN BRCA1 Y BRCA2

Se analizó la presencia de grandes reestructuraciones génicas en BRCA1 y BRCA2, utilizando la técnica de MLPA (amplificación por PCR multiplex dependiente de ligación).

Se buscaron reordenamientos de BRCA1 en 60 pacientes y de BRCA2 en 20 pacientes. Los pacientes incluidos carecían de mutaciones patogénicas puntuales en el estudio previo y presentaban antecedentes familiares (tres o más casos de cáncer de mama en la familia) o personales (cáncer de mama con menos de 40 años) importantes.

Encontramos un reordenamiento de BRCA1 en un paciente de los 60 estudiados. El análisis de la región codificante de los genes BRCA 1 y BRCA2 de esta paciente no reveló la presencia de ninguna mutación. Se realizó a continuación el análisis del DNA genómico de la muestra mediante MLPA. Este estudio puso de manifiesto una disminución en el pico de fluorescencia correspondiente al exón 14.

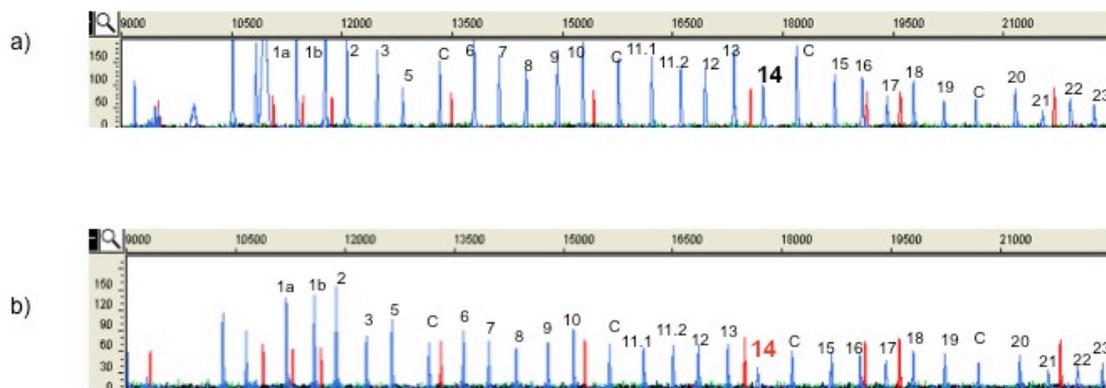


Figura 33: Cromatograma resultante del análisis mediante MLPA. a) DNA control; b) DNA de la paciente.

El análisis mediante RT-PCR del RNA de la paciente con oligonucleótidos diseñados en las secuencias codificantes de los exones 13 y 15 (c13F y c15R) nos permitió detectar en la probando un fragmento de 434 pb y otro de 307 pb. El primero corresponde al producto de amplificación que contiene los exones 13, 14 y 15 y el segundo al que incluye los exones 13 y 15. La consecuencia de la eliminación del exón 14 del cDNA del gen BRCA1 es la aparición de un codón prematuro de parada en el exón 15 y la generación de una proteína truncada de 1461 aminoácidos.

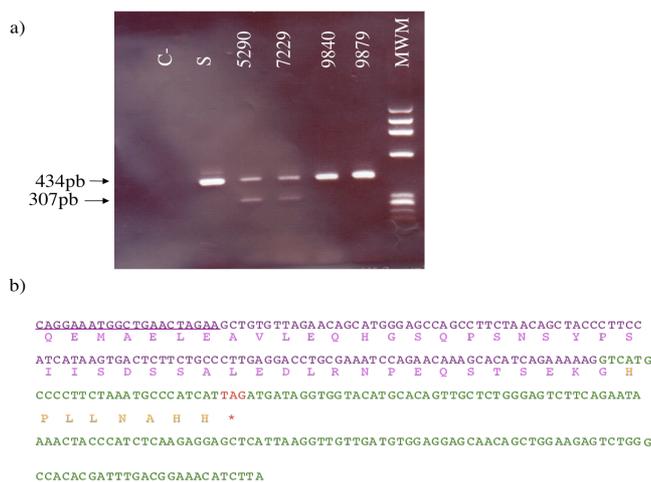


Figura 34: a) fragmentos amplificados con los oligonucleótidos c13F y c15R. C-, control negativo; S, sano; 5290, probando; 7229, 9840, 9879, otros miembros de la familia. b) secuencia de cDNA de los exones 13 y 15 de BRCA 1 y su correspondiente traducción. En morado aparece la secuencia del exón 13 y en verde la del exón 15. El codón de parada aparece marcado en color rojo.

Esta mutación también fue confirmada en el DNA genómico de la paciente. La amplificación del DNA genómico con oligonucleótidos localizados en los intrones 13 y 15 (g13F y g14R) respectivamente, generó un fragmento de aproximadamente 3,5Kb en lugar del de 8,1Kb que correspondería al fragmento sin reordenar. La posterior subclonación y secuenciación de este producto de amplificación reveló la localización del punto de rotura y los extremos de la pérdida (nucleótido 47839, intrón 13 y nucleótido 52789, intrón 14) así como la inserción de una secuencia de 195 nucleótidos perteneciente a la familia de secuencias Alu Ya5. La inserción de secuencias pertenecientes a esta familia se ha encontrado en distintos tipos de enfermedades así como en otros reordenamientos que afectan a BRCA1

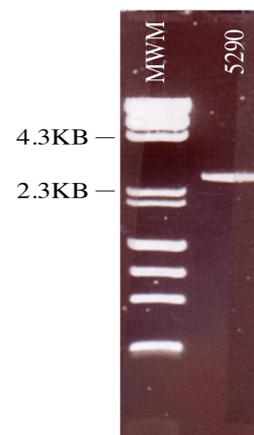


Figura 35: Producto de amplificación del DNA genómico de la probando empleando los oligonucleótidos g13F y g14R.

Describimos por tanto, un reordenamiento del gen BRCA1 en el que está implicada una secuencia Alu, lo que refuerza la idea de que estas secuencias desempeñan un papel importante en la generación de estas alteraciones.

DISCUSIÓN

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 dan lugar al 40-80% de todos los cánceres de mama y ovario hereditarios (Claus et al. 1991, Easton et al. 1995 Schubert et al. 1997, Antoniou et al., 2003; Stratton et al., 2008). Los portadores de mutaciones en alguno de estos genes tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama y/o ovario a lo largo de su vida.

En este estudio, hemos realizado la búsqueda de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 en 343 probandos de familias de alto riesgo. La localización de probandos portadores mediante el diagnóstico genético permite un control médico de los mismos y la adopción de medidas preventivas en aquellos familiares sanos portadores de mutación.

1.- RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES PUNTUALES EN BRCA1 Y BRCA2

Tras el análisis de los 343 probandos, encontramos en total 110 mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. De entre las alteraciones encontradas, un 17,27% resultaron ser patogénicas, un 54,55% polimorfismos neutrales y un 28,18% variantes sin clasificar. Estos porcentajes varían un tanto respecto a otros estudios españoles, probablemente debido a las distintas técnicas de detección empleadas y a la distribución geográfica de las mutaciones (Beristain et al., 2007; Miramar et al., 2008).

Las 110 mutaciones totales fueron encontradas en el grupo de 343 probandos supone una tasa de mutación del 32,07% en nuestra población en estudio.

En la tabla 44 se detallan las frecuencias y porcentajes de mutación observados en este trabajo.

Tabla 44: Número de mutaciones de cada tipo encontradas en BRCA1 y BRCA2 y su porcentaje sobre el total.

Tipo de mutación		Número de mutaciones encontradas en BRCA1	Número de mutaciones encontradas en BRCA2	Mutaciones encontradas en total	Porcentaje sobre el total de mutaciones
Patogénicas	Cambios en el marco de lectura (“frameshift”)	4	8	12	10,9%
	Mutaciones sin sentido (“nonsense”)	1	2	3	2,73%
	Cambios de aminoácido patogénicos	2	0	2	1,82%
	Mutaciones que afectan a la maduración del RNA	2	0	2	1,82%
Total de mutaciones patogénicas		9	10	19	17,27%
Polimorfismos neutrales	Mutaciones silenciosas	7	11	18	16,36%
	Cambios de aminoácido neutrales	7	9	15	13,64%
	Variantes intrónicas	12	14	26	23,64%
Total de polimorfismos		26	34	60	54,55%
Variantes sin clasificar	Cambios de aminoácido puntuales	16	15	31	28,18%
Total de variantes sin clasificar		16	15	31	28,18%
Total de todas las mutaciones		51	59	110	100%

1.1 MUTACIONES PATOGENICAS

Encontramos en total 19 mutaciones patogénicas puntuales distintas, 9 en BRCA1 y 10 en BRCA2 en los 343 probandos analizados. Esto representa una frecuencia del 5,5% de mutaciones patogénicas en la población escrutada. Las mutaciones patogénicas fueron detectadas en 30 familias, lo que supone un 9% de portadores de mutación en este estudio. Si eliminamos los grupos en los que no han aparecido mutaciones patogénicas obtenemos una subpoblación de 253 probandos en la cual la frecuencia de mutaciones patogénicas asciende al 12%. Esta frecuencia de alteraciones patogénicas encontradas es mucho más bajo que el referido en algunas publicaciones españolas (Osorio et al., 2000; de la Hoya et al., 2002 (b); Blesa et al., 2000; Campos et al., 2001). Sin embargo, en otros estudios encuentran un porcentaje similar al nuestro (Diez et al., 1999; Duran et al., 2003; Infante et al., 2006; Beristain et al., 2007). La razón de estas discrepancias radica en el hecho de que la proporción de mutaciones patogénicas varía ampliamente entre las distintas poblaciones. Los

criterios para la elección de las familias en estudio y la distinta distribución geográfica de las mutaciones podrían estar detrás de esta variabilidad.

El subgrupo en el que hemos encontrado más mutaciones patogénicas es en aquellas familias que cumplen simultáneamente tres criterios: un caso de cáncer de mama u ovario en un menor de cuarenta años, dos casos de cáncer mama en familiares de primer grado con uno menor de 50 años y tres o más casos de cáncer de mama u ovario en familiares de primer o segundo grado (criterios B, D, y G). En este grupo de 31 pacientes, 8 de ellos (un 26%) presentaban una alteración patogénica.

El segundo grupo con más representación son los casos a edades tempranas (criterio B): en el grupo de pacientes menores de cuarenta años (88 pacientes), encontramos 4 pacientes (un 4,5%) con mutaciones patogénicas. Se trata de un grupo muy heterogéneo, ya que pueden aparecer probandos que realmente representen un cáncer hereditario aunque no tengan otros antecedentes familiares, y otros probandos que padecen un cáncer esporádico pero que por factores diversos ha aparecido a una edad tan temprana (factores hormonales, ambientales...etc.). Se necesitarían datos pormenorizados sobre el estilo de vida y la historia reproductiva del probando para poder dividir este grupo en subgrupos mejor caracterizados.

La mayoría de las mutaciones patogénicas restantes se agrupan en aquellas familias que cumplen varios criterios simultáneamente y, en especial, en aquellas con uno o más casos de cáncer de ovario (2,62%).

En la tabla 45 se esquematizan los grupos de familias incluidos en el estudio según los criterios que cumplen, así como el número de familias con mutaciones patogénicas que hay en cada grupo.

Tabla 45: Grupos de familias según los criterios que cumplían para su inclusión en el estudio y número de mutaciones patológicas encontradas en cada uno de los grupos.

Número de familias	CRITERIOS DE INCLUSIÓN								Familias con mutaciones patológicas en cada grupo
	Un caso de cáncer de mama bilateral (A)	Un caso de cáncer de mama u ovario antes de los cuarenta años (B)	Un caso de cáncer de mama en el varón (C)	Dos casos de cáncer de mama en primer grado, uno antes de los 50 años (D)	Un caso de cáncer de mama antes de los 50 años otro de ovario* (E)	Dos casos de cáncer de ovario a cualquier edad * (F)	Tres o más casos de cáncer de mama y/o ovario, dos de ellos en primer grado (G)	Otros casos (H)	
6									
89									4
5									
17									2
5									
15									
3									
4									
1									
4									
15									
5									1
3									1
14									
1									
19									1
2									1
5									2
3									1
3									1
6									
1									1
31									8
2									
1									
2									
1									
4									
1									
2									1
1									1
2									1
1									1
1									1
68									2

* En parientes de primer o segundo grado

1.1.1 MUTACIONES PATOGENICAS DE BRCA1

Encontramos 16 familias que portaban 9 alteraciones patogénicas distintas en BRCA1. Por tanto, un 5% de nuestra población era portadora de alguna mutación patogénica en BRCA1. La mitad de estas familias presentaban uno o más casos de cáncer de ovario, y la mayoría tres o más casos de cáncer de mama y/o ovario en primer o segundo grado.

Tabla 46: Resumen de las mutaciones patogénicas encontradas en BRCA1 y familias en que aparecen.

TIPO DE MUTACIÓN	MUTACIÓN	CODON	EXÓN	EFEECTO EN LA PROTEÍNA	VECES EN BIC	Nº DE FAMILIAS EN QUE APARECE
Cambios en el marco de lectura	1793delA	558	11	Codon de parada en 571	6	3
	2031delG	638	11	Codon de parada en 650	1	2
	3533insA	1138	11	Codon de parada en 1140	No está	1
	4284delAG	1389	12	Codon de parada en 1389	11	1
Mutaciones sin sentido "nonsense"	C1806T	563	11	Q563X	88	3
Cambios de aminoácido patogénicos	G5236A	1706	18	G1706E	7	2
	C5242A	1708	18	A1708E	45	2
Mutaciones que afectan a la maduración del RNA	IVS20+1G>A	-	Intrón 20	Codon de parada en 1737 (por pérdida del exón 20)	42	1
	IVS23+3A>C	-	Intrón 23	Codon de parada en 1181 (por pérdida del exón 23)	No está	1

La mutación **1793delA** es la primera vez que se describe en población española, ya que las entradas registradas en el BIC y en la literatura proceden de poblaciones latina y caucásica americana (Judkins et al., 2005 (a); Spearman et al., 2008). Aparece de forma recurrente en nuestra población: en tres familias del total de familias estudiadas (n=343), lo que hace un 0,87% y en el 10% de las portadoras de mutaciones patogénicas (n=30). Este dato podría indicar un efecto fundador en nuestro país, aunque tres familias es un número escaso para que el estudio sea significativo. Si aparece de nuevo en futuros trabajos se confirmaría nuestra hipótesis.

La mutación 2031delG había sido descrita por nuestro grupo y otros colaboradores en varios trabajos españoles (Diez et al., 2003; Salazar et al., 2006; de Juan et al., 2008). Esta mutación está registrada en el BIC por nuestro grupo y parece ser propia de la población española, pues no aparece en la literatura en otras poblaciones. En nuestro estudio aparece en dos familias, lo que supone el 6,6% de las familias con mutaciones patogénicas. Además, cabe destacar que en ambas familias portadoras aparecen casos de cáncer de ovario.

La mutación 3533insA no aparece registrada en el BIC ni en la literatura, por lo que podemos afirmar que es de nueva descripción. Esta mutación provoca un codon de parada en la posición 1140 de la proteína y da lugar a una proteína que carece de parte del extremo carboxilo terminal y se presupone no funcional. En nuestro estudio aparece junto a las variantes neutrales de BRCA1 D693N y S694S, en una familia con fuertes antecedentes familiares: un caso de cáncer de mama bilateral a los 38 y 48 años, y un pariente de primer grado un cáncer de mama a los 53 años.

La mutación 4284delAG había sido descrita en poblaciones de origen étnico diverso, pero no en la española (Dong et al., 1998; Liede et al., 2002; Meindl, German Consortium 2002; Van der Hout et al., 2006). Aparece en una familia cuyo probando fue diagnosticada de un cáncer de mama bilateral muy joven (a los 31 y 36 años), pero que no tenía familiares de primer ni segundo grado afectos.

La alteración C1806T (Q563X) aparece profusamente en la literatura, especialmente en población sueca, donde es mutación fundadora (Johansson et al., 1996; Meindl, German Consortium 2002; Pohlreich et al., 2003; John et al., 2007; Brozek et al., 2008). Esta mutación provoca la terminación de la traducción en el aminoácido 563 de BRCA1, situado antes de las señales de localización nuclear, de los sitios de interacción con diversas proteínas y de los dominios BRCT. Esta proteína truncada no ha podido ser detectada por inmunoprecipitación ni Western-blott, por lo que se presupone que el RNA que la codifica es degradado a través del “nonsense-mediated decay”, mecanismo de vigilancia de los transcritos posterior a la transcripción, que elimina los RNA mensajeros portadores de un codon de parada prematuro antes de ser traducidos. De esta forma se previene la aparición de proteínas aberrantes y no funcionales (Schell et al., 2002). En nuestra población la mutación

Q563X aparece en tres familias, lo que supone un 10% de las familias con alteraciones patogénicas. Esta mutación ya había sido descrita por nuestro grupo previamente (Salazar et al., 2006).

La mutación G5236A (G1706E) es un cambio de aminoácido que se ha demostrado patogénico: El cambio se produce en un aminoácido conservado, entre dos residuos de lisina cargados positivamente; al intercambiarse por un residuo de glutámico se introduce una carga negativa que se ha visto que altera la estructura tridimensional de la proteína. Además, en ensayos funcionales se ha visto que reduce la actividad transcripcional de BRCA1 (Mirkovic et al., 2004; Carvalho et al., 2007; Abkevich et al., 2004; Williams et al., 2003; Lovelock et al., 2006). Por todo ello, está demostrado que se trata de una alteración patogénica. Esta mutación ha sido descrita en diversos trabajos españoles, lo que sugiere un efecto fundador (Osorio et al., 2000 y 2002; de la Hoya et al., 2002 (a y b); Díez et al., 2003; Infante et al., 2006). En nuestra población aparece en dos familias (6,6% del total de familias portadoras de mutaciones patogénicas) cuyos probandos curiosamente presentan un cáncer de mama con menos de 40 años. En otros trabajos también aparece en pacientes con aparición temprana de cáncer de mama (Osorio et al., 2000; de la Hoya et al., 2002 (b)). Un análisis extenso en un grupo de casos jóvenes bien caracterizados podría determinar si esta mutación tiene que ver con la aparición temprana del cáncer de mama.

El caso de C5242A (A1708E) es similar: se localiza en el exón 18, en la misma región altamente conservada que G5236A (G1706E) (Futreal et al., 1994; Szabo et al., 1996). El cambio de alanina por glutámico destruye la actividad transactivadora transcripcional del dominio C-terminal de BRCA1 y altera la estructura tridimensional de BRCA1 y su unión a otros factores como el receptor de estrógenos α (Chapman and Verma, 1996; Monteiro et al., 1996; Vallon-Christersson et al., 2001; Kawai et al., 2002; Lovelock et al., 2006 y 2007; Gough et al., 2007). Además, no aparece en controles sanos (Greenman et al., 1998). Esta mutación aparece en poblaciones diversas y de forma recurrente en la española, mostrando un posible efecto fundador (Diez et al., 2003; de la Hoya et al., 2002; Infante et al., 2006). En nuestro grupo de pacientes aparece en dos probandos que fueron diagnosticados de cáncer de mama con menos de 40 años, pero cuyas familias también cumplen otros criterios de inclusión. Estas dos familias constituyen un 6,6% de las familias portadoras de mutaciones

patogénicas, porcentaje similar al obtenido en otros estudios españoles (de la Hoya et al., 2002 (a y b); Infante et al., 2006).

Respecto a las mutaciones que afectan a la maduración del RNA, hemos encontrado dos distintas en nuestra serie, una ya conocida y otra de nueva descripción. La mutación IVS20+1G>A provoca la pérdida del exón 20, un cambio en la fase de lectura y la aparición de un codon de parada en posición 1737 de la proteína (Tesoriero et al., 2005). Esta alteración apareció en una de las familias en estudio. El probando fue diagnosticado de cáncer de mama con 36 años, y en la familia existían otros 5 casos de cáncer de mama, además de otros tipos de tumor. En los familiares estudiados se comprobó que la mutación segregaba con la enfermedad, pues apareció en el probando y en otros dos parientes afectados. Esta mutación ha sido descrita en diversas poblaciones incluida la española (Verhoog et al., 2001; de la Hoya et al., 2002 (a y b)); Osorio et al., 2003).

Por último, la mutación IVS23+3A>C se describe por primera vez en este trabajo. Se trata de un cambio de adenina por citosina en la región adyacente al sitio clásico de procesamiento del intrón 23. Se comprobó mediante RT-PCR que este cambio provocaba la pérdida del exón 23, lo cual daba lugar a un cambio en la fase de lectura y a la aparición de un codon de parada prematuro en el exón 24 (residuo 1813 de la proteína). Este RNAm en caso de traducirse daría lugar a una proteína truncada y probablemente no funcional. El exón 23 codifica para parte del extremo carboxilo-terminal de BRCA1, en concreto el segundo dominio BRCT. Este dominio es de gran importancia, ya que interacciona con múltiples proteínas participando en activación transcripcional, remodelación de cromatina y otras funciones importantes de BRCA1. Por ello, la pérdida del exón 23 dará lugar a una proteína no funcional que carece en parte de su actividad supresora de tumores (figura 36).

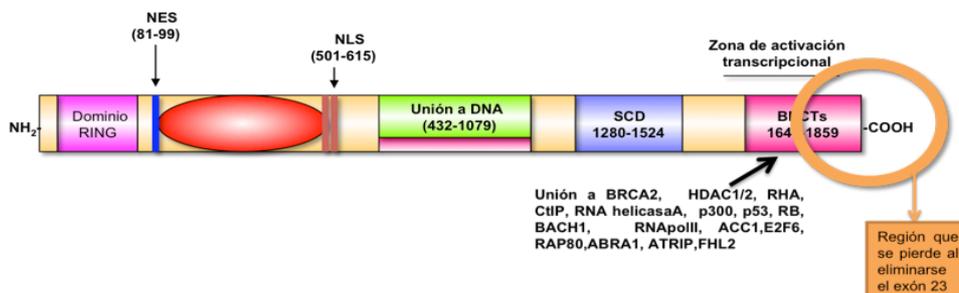


Figura 36: Consecuencia en la proteína por la pérdida del exón 23 debido a la mutación IVS23+3A>C

Esta mutación apareció en una de las familias analizadas (3,3% de las portadoras de mutación), en un probando con un cáncer de mama diagnosticado a los 29 años. Al estudiar también al padre del probando se comprobó que la herencia de esta mutación provenía de la línea paterna, en donde encontramos otro caso de cáncer de mama, uno de colon y otro de estómago. El resto de parientes estudiados eran familiares de primer grado sanos que no portaban la mutación.

En conjunto, la mayoría de mutaciones patogénicas encontradas en BRCA1 en nuestro estudio se concentran en los exones 11,12 y 18. Cinco de las nueve mutaciones encontradas en BRCA1 son descritas también por otros grupos españoles, por lo que el espectro mutacional es similar al del conjunto de España.

1.1.2 MUTACIONES PATOGENICAS DE BRCA2

Tras el rastreo encontramos 10 mutaciones patogénicas en BRCA2, en 14 de las 343 familias estudiadas. Por tanto, el 4% de nuestros pacientes portaban una mutación en BRCA2. El tipo de mutaciones patogénicas encontradas en BRCA2 se restringe a las de cambio en el marco de lectura y las sin sentido (“nonsense”), no habiendo encontrado mutaciones que afecten a la maduración del RNA ni cambios de aminoácido patogénicos. El 40% de estas mutaciones encontradas en BRCA2 son de nueva descripción.

En la tabla 47 se resumen el total de mutaciones patogénicas encontradas en el gen BRCA2, así como el número de familias en que aparecen.

Tabla 47: Resumen de las mutaciones patogénicas encontradas en BRCA2 y familias en que aparecen.

TIPO DE MUTACIÓN	MUTACIÓN	CODON	EXÓN	EFEECTO EN LA PROTEÍNA	VECES EN BIC	N ° DE FAMILIAS EN QUE APARECE
Cambios en el marco de lectura	3036delACAA	936	11	Codon de parada en 959	105	5
	5319delA	1697	11	Codon de parada en 1704	No está	1
	5344delAATA	1706	11	Codon de parada en 1710	No está	1
	6503delTT	2092	11	Codon de parada en 2098	93	1
	6678insA	2150	11	Codon de parada en 2175	2	1
	8370del11	2714	18	Codon de parada en 2716	No está	1
	8873delACCA	2882	21	Codon de parada en 2889	No está	1
	9254delATCAT	3009	23	Codon de parada en 3016	10	1
Mutaciones sin sentido "nonsense"	G373T	49	3	E49X	17	1
	C8800T	2858	20	Q2858X	1	1

La mutación 3036delACAA es la única de BRCA2 que aparece de forma recurrente, ya que la encontramos en 5 de las familias analizadas. Esto representa un 1,46% sobre el total de familias, un 16,6% sobre el total de familias con mutaciones patogénicas, y un 35,71% de las portadoras de mutación en BRCA2. Estamos ante una mutación fundadora en la población española, ya que en este y otros trabajos publicados explica un alto porcentaje de las familias portadoras de mutación (Osorio et al., 1997; Duran et al., 2003; Llort et al., 2002). Aparece también en otras poblaciones (alemana, holandesa, inglesa, italiana...etc.), pero a menudo con una frecuencia mucho menor y no se ha podido demostrar que provenga de un ancestro común (BIC, Neuhausen et al., 1998; Osorio et al., 1997; Spitzer et al., 2000; Meindl, German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer., 2002; Ozcelik et al., 2003). En todas las familias de nuestro estudio en que apareció esta mutación había algún caso de cáncer de mama menor de 40 años y en la mayoría de ellas tres o más casos en primer o segundo grado. En dos de las familias aparecían casos de cáncer bilateral.

El resto de mutaciones que cambian el marco de lectura aparecieron tan solo en una familia cada una.

Cabe destacar que encontramos cuatro cambios en el marco de lectura de nueva descripción: 5319delA, 5344delAATA, 8370del11, y 8873delACCA. Todos provocan la aparición de un codon de parada prematuro y la generación de una proteína truncada y presuntamente no funcional.

Las familias portadoras de 5319delA y 8873delACCA cumplían tan solo el criterio de dos casos de cáncer de mama en primer grado, uno menor de 50 años (criterio D). Sin embargo, presentaban varios casos de otros tipos de tumores (colon, próstata...etc.). La familia portadora de 5344delAATA se encuentra entre las 8 familias que cumplen los criterios B,D,G y son portadoras de mutaciones patogénicas. La familia portadora de 8370del11 es un caso particular, ya que no cumple los criterios de inclusión estrictamente: el probando es una mujer sana, cuya madre tuvo un cáncer de mama a los 42 años. El resto de antecedentes familiares no se pudieron confirmar, y entre los familiares de primer grado no había ningún otro afecto. Esta es una de las familias problemáticas, ya que constan de pocos individuos y los datos sobre los familiares fallecidos no son claros. Sin embargo, hay que tomarlas con mucha cautela, ya que, como en este caso, pueden ser portadoras de mutación. El trabajo de la unidad de consejo genético consiste en valorar cada familia por separado y determinar si es necesario hacerle el estudio.

Las mutaciones restantes que cambian el marco de lectura habían sido descritas previamente.

La alteración 6503delTT está ampliamente descrita en la literatura en poblaciones diversas (como fundadora en canadienses de la zona francesa, en Alemania y en Finlandia) y a menudo aparece en cis junto al polimorfismo K3326X, probablemente procedentes de un ancestro común. Además, al igual que otras formas truncadas de BRCA2 permanece excluida en el citosol no pudiendo ejercer sus funciones nucleares (Haraldsson et al., 1998; Spain et al., 1999; Khitto et al., 2001; Verhoog et al., 2001; Lubinski et al., 2004; Zeegers et al., 2004; Hartikainen et al., 2007; Simard et al., 2007). En nuestra serie aparece en una familia cuyo probando fue diagnosticada de un cáncer de mama a los 35 años. La madre de la probando también tuvo un cáncer de mama joven, a los 38 años, y una prima materna a los 39. Parece que en esta familia la mutación, además de aumentar la predisposición al cáncer, provoca su aparición a edades tempranas. En algunos trabajos se observa también en pacientes jóvenes

(Lalloo et al., 2006; de SanJosé et al., 2003). Esta mutación aparece en varios trabajos españoles, incluido el de Caldes, donde aparece junto al cambio de aminoácido patogénico de BRCA1 A1708E (Caldes et al., 2002; Llord et al., 2002; de Sanjosé et al., 2003; Diez et al., 2003).

Sobre la mutación 6678insA no hay mucha información disponible: está registrada 2 veces en el BIC con muestras del oeste de Europa y aparece tan solo en una publicación (Fries et al., 2002). En nuestro estudio aparece en una familia cuyo probando tuvo un cáncer de mama a los 32 años y en su línea materna hay otros 7 casos, 3 en familiares de primer grado del probando.

La mutación 9254delATCAT está considerada mutación fundadora española, a pesar de que en nuestra población aparece tan solo en una familia. En esta familia la mutación se heredó por la línea paterna, donde hay siete casos de cáncer de mama además del probando. Esta alteración aparece en diversos trabajos, incluyendo varios españoles (Osorio et al., 1997; Neuhausen et al., 1998; Gomendio et al., 1999; Diez et al., 2000; Llord et al., 2002; de Sanjosé et al., 2003; Martínez-Ferrandis et al., 2003). En el trabajo de Campos et al. encuentran esta mutación en 12 familias de origen español y comprueban que aparece en un haplotipo común originado hace 92 generaciones, lo que demuestra el efecto fundador (Campos et al., 2003 (b)).

Las mutación sin sentido (“nonsense”) E49X apareció en una familia con cuatro casos de cáncer de mama, uno de ellos en un varón y otro en una mujer menor de 40 años. Esta alteración ha sido descrita en varias publicaciones, ninguna con pacientes españoles pero sí con población latinoamericana (Bergthorsson et al., 2001; Pal et al., 2005; Gallardo et al., 2006; Vogel et al., 2007). La mutación Q2858X también apareció en una de las familias analizadas, en la cual había tres casos de cáncer de mama, dos de ellos en menores de 50 años. Sobre esta mutación tampoco hay mucha información publicada. Está registrada una vez en el BIC y aparece en una familia italiana (Santarosa et al., 1999 (b)).

En resumen, las mutaciones patogénicas encontradas en BRCA2 se concentran en su mayoría en el exón 11. De las diez mutaciones encontradas, cuatro son de nueva descripción (5319delA, 5344delAATA, 8370del11 y 8873delACCA), y tres ya habían sido descritas en población española de forma recurrente (3036delACAA, 6503delTT, 9254delATCAT).

1.2 POLIMORFISMOS NEUTRALES

Encontramos un total de 60 polimorfismos neutrales, 26 en BRCA1 y 34 en BRCA2. En conjunto representan el 54,55% del total de alteraciones encontradas. Algunos de estos polimorfismos aparecen con una frecuencia muy alta en nuestro grupo de pacientes en estudio, por lo que podemos asumir que, por extensión, son variantes propias de nuestra población general.

En este grupo tan amplio de variantes neutrales encontramos que la mayoría son polimorfismos bien descritos en el BIC y en la bibliografía: en estudios poblacionales a nivel mundial o que incluyen un gran número de individuos, estudios con datos de no cosegregación, de aparición junto a una variante patogénica o de permitir el correcto procesamiento del RNA. Existe un subgrupo minoritario que no dispone de tantos datos para confirmar su neutralidad pero que, sin embargo, dispone de indicios para clasificarlos como polimorfismos a la espera de nuevos estudios que lo corroboren.

1.2.1 POLIMORFISMOS DE BRCA1

En BRCA1 hemos encontrado 26 polimorfismos neutrales, en concreto, 7 variantes silenciosas, 7 cambios de aminoácido sin importancia clínica y 12 variantes intrónicas (tabla 48).

Tabla 48: Total de polimorfismos encontrados en BRCA1 en las 343 familias estudiadas.

TIPO DE MUTACIÓN	EXÓN	MUTACIÓN	CODON	EFECTO EN LA PROTEÍNA	VECES EN BIC	N° Y PORCENTAJE DE FAMILIAS EN QUE APARECE
Mutaciones silenciosas	9	C710T	197	C197C	31	2 (0,58%)
	11	A1100G	327	T327T	1	2 (0,58%)
	11	C2201T	694	S694S	13	98 (28,57%)
	11	T2430C	771	L771L	25	73 (21,28%)
	11	A2852G	911	G911G	No está	1 (0,29%)
	13	T4427C	1436	S1436S	35	120 (34,98%)
	19	A5294G	1725	E1725E	No está	1 (0,29%)
Cambios de aminoácido sin importancia clínica	11	A1186G	356	Q356R	82	35 (10,20%)
	11	C2731T	871	P871L	26	79 (23,03%)
	11	G2196A	693	D693N	16	34 (9,91%)
	11	A3232G	1038	E1038G	37	81 (23,61%)
	11	A3667G	1183	K1183R	33	127 (37,03%)
	15	G4654T	1512	S1512I	53	3 (0,87%)
	16	A4956G	1613	S1613G	36	168 (49%)
	INTRÓN	MUTACIÓN			VECES EN BIC	N° Y PORCENTAJE DE FAMILIAS EN QUE APARECE
Variantes intrónicas	5'UTR	IVS1-115T>C (101-115T>C)			1	130 (37,9%)
	1	IVS2-14C>T (200-14C>T)			52	5 (1,46%)
	6	IVS7-34T>C (561-34T>C)			9	86 (25,07%)
	7	IVS8-58delT (667-58delT)			8	127 (37,03%)
	9	IVS9+44A>G (712+44A>G)			3	1 (0,29%)
	12	IVS13-10C>T (4477-10C>T)			25	3 (0,87%)
	13	IVS14-63A>G (4604-63A>G)			1	127 (37,03%)
	16	IVS17-53C>T (5194-53C>T)			2	18 (5,25%)
	18	IVS18+66G>A (5271+66G>A)			9	120 (35%)
	20	IVS20+60insGTATTCCACTCC (5396+60ins12pb)			26	2 (0,58%)
	22	IVS22+8T>C (5525+8T>C)			14	1 (0,29%)
24	IVS24+36C>G (5711+36C>G)			No está	2 (0,58%)	

La mayoría de estas variantes disponen de argumentos suficientes para ser clasificadas como neutrales gracias a los datos registrados en el BIC, los trabajos publicados al respecto, o a los resultados del presente estudio. Entre dichos argumentos encontramos la alta frecuencia con que aparecen en algunos estudios, su presencia en controles, la aparición

conjunta con mutaciones patogénicas en el mismo gen...etc. En la tabla 49 se resumen estas variantes neutrales bien caracterizadas y las razones de su benignidad.

Tabla 49: Variantes neutrales bien caracterizadas de BRCA1 y razones que confirman su neutralidad.

VARIANTES SILENCIOSAS			
Exón	Mutación	Efecto en la proteína	Confirmación de su neutralidad
9	C710T	C197C	En nuestro estudio aparece junto a la patogénica A1708E.
11	A1100G	T327T	Encontrada en controles (Ostrander, BIC).
11	C2201T	S694S	En nuestro estudio tiene una alta frecuencia (en casi el 29% de las familias) y aparece junto a varias patogénicas: junto a Q563X en dos familias, con 2031delG en una familia y con IVS23+3A>C en otra.
11	T2430C	L771L	En Baudi et al., ven que no segrega con la enfermedad y que aparece en 30 de 100 controles (Baudi et al., 1998). En nuestro estudio tiene una frecuencia alta: 21% aproximadamente.
13	T4427C	S1436S	En nuestro estudio aparece junto a varias patogénicas: Q563X y A1708E. También tiene una frecuencia alta (en el 35% de las familias estudiadas).
CAMBIOS DE AMINOÁCIDO NEUTRALES			
Exón	Mutación	Efecto en la proteína	Confirmación de su neutralidad
11	A1186G	Q356R	Aparece en controles en varios trabajos (Wenham et al., 2003; Durocher et al., 1996; Dunning et al., 1997; Auranen et al., 2005).
11	G2196A	D693N	En Durocher et al. aparece con frecuencia similar en pacientes y controles (Durocher et al., 1996). En nuestro estudio aparece junto a las patogénicas 3533insA y G1706E.
11	C2731T	P871L	En varios trabajos aparece con frecuencia similar en pacientes y controles (Menzel et al., 2004; Auranen et al., 2005). En nuestro estudio aparece en un alto porcentaje de familias (23%); y junto a las patogénicas IVS23+3A>C y 2031delG.
11	A3232G	E1038G	En nuestro estudio aparece junto a las patogénicas Q563X, 2031delG y IVS23+3A>C. También en general tiene una frecuencia alta (24% de las familias).
11	A3667G	K1183R	En Saxena et al. aparece en mayor proporción en controles que pacientes (Saxena et al., 2006). En nuestro estudio aparece con frecuencia alta (37% de las familias) y en tres familias junto a las patogénicas Q563X, 2031delG y IVS23+3A>C.
15	G4654T	S1512I	No se encuentra en ningún dominio funcional importante. En Phelan et al. tiene una frecuencia alélicas similar en casos y controles, no cambia la activación transcripcional y aparece junto a patogénicas (Phelan et al., 2005). En Deffenbaugh et al. aparece en el doble de controles que de pacientes, y también junto a patogénicas (Deffenbaugh et al., 2002).
16	A4956G	S1613G	En Saxena et al. aparece en más del tripe de controles que de casos (Saxena et al., 2006). En nuestro estudio tiene una frecuencia muy alta (en el 49% de las familias), y aparece junto a las patogénicas Q563X, 2031delG y A1708E.
VARIANTES INTRÓNICAS			
Intrón	Mutación	Confirmación de su neutralidad	
5'UTR	IVS1-115T>C (101-115T>C)	En nuestro estudio aparece con frecuencia alta (37,9% de las familias estudiadas), y además en dos familias aparece junto a patogénicas: Q563X, 2031delG y A1708E.	
1	IVS2-14C>T (200-14C>T)	En Judkins et al. aparece en un haplotipo junto a una patogénica (Judkins et al., 2005 (a)). En Claes et al. a pesar de no encontrarla en 100 controles dicen que al ser un cambio de una pirimidina por otra probablemente no afecte a la maduración del RNA (Claes et al., 2003).	
6	IVS7-34T>C	En Hedau no la encuentran en controles pero analizan tan solo 56 individuos (Hedau et al., 2004). En artículos españoles aparece con frecuencia alta (Diez et al.,	

	(561-34T>C)	2003; Infante et al., 2006). En nuestro estudio aparece en un 25% de las familias analizadas; además, en dos familias aparece junto a las patogénicas 1793delA e IVS20+1G>A respectivamente.
7	IVS8-58delT (667-58delT)	Aparece con frecuencia alta en diversos trabajos (Sinclair et al., 2000;Reeves et al., 2003; Infante et al., 2006). En Pyne et al. analizan el RNA y ven que el portador de esta variante tiene un procesamiento del mismo totalmente normal comparándolo con un control no mutado (Pyne et al., 1999). En nuestro estudio aparece en el 37% de las familias y en una de ellas junto a una patogénica (A1708E).
12	IVS13-10C>T (4477-10C>T)	El estudio Suthers en Australia confirmó un procesamiento normal de los exones 11 al 15 en un portador de esta variante (BIC). En Judkins et al. aparece junto a una patogénica y no segrega con la enfermedad (Judkins et al., 2005 (a)). En Konstantopoulou et al. aparece en homocigosis (Konstantopoulou et al., 2008)
13	IVS14-63A>G (4604-63A>G)	En nuestro estudio aparece en el 37% de las familias, y en dos de ellas junto a las patogénicas Q563X y A1708E respectivamente.
18	IVS18+66G>A (5271+66G>A)	Aunque no aparece en controles en la bibliografía, tiene una frecuencia alta (alrededor del 30%) en los estudios publicados (Diez et al., 1999; Tworek et al., 1999; BIC). En nuestro estudio aparece en el 35% de las familias, y en cuatro de ellas junto a patogénicas: 1793delA, Q563X, G1706E, y A1708E respectivamente.
20	IVS20+60ins11 (5396+60ins12pb)	Aparece en 3 de 415 controles (Ostrander) y 4 de 200 (Krzyzosiak) (BIC).

Tradicionalmente las variantes silenciosas se han considerado neutrales ya que no tienen efectos sobre la proteína, pero se ha demostrado que algunas de ellas afectan a la estabilidad del RNA mensajero o a su procesamiento (D’Souza et al., 1999; Llewellyn et al., 1996). Esto no siempre es un efecto negativo, ya que algunas podrían incluso proteger del efecto de otros cambios patogénicos (Nielsen et al., 2007).

En nuestro estudio, la variante **A2852G (G911G)** aparece en un único paciente. El análisis mediante el programa “ESEfinder” reveló que aumenta ligeramente la afinidad de uno de los sitios ESE ya existentes por las proteínas SR, pero no crea sitios nuevos, por lo que podemos decir que en principio no afectará al procesamiento correcto del RNA. Esta variante no está registrada en el BIC, pero fue detectada en otra familia de alto riesgo en nuestra región (Esteban Cardeñosa et al., 2008).

La variante **A5294G (E1725E)** no está registrada en el BIC; aparece en dos artículos españoles, pero no la encuentran en población control (Infante et al., 2006; Beristain et al., 2007). En nuestro estudio aparece en un único paciente y el análisis con ESEfinder predice que no afecta en absoluto a los sitios ESE, por lo que podemos considerarlo un polimorfismo neutral poco frecuente. Sería necesario un estudio más amplio en controles y un análisis del RNA de los pacientes portadores de estas variantes para confirmar fehacientemente su neutralidad.

Respecto a las variantes intrónicas, está asumido que aquellas que se encuentran relativamente alejadas de los sitios clásicos de procesamiento, en principio, no afectarán a la maduración. Este es un tema controvertido ya que en los intrones existe otra secuencia consenso: la región de ramificación hacia el centro del intrón; además, también existen secuencias que promueven (“intronic splicing enhancers” o “ISEs”) o inhiben (“intronic splicing silencers” o “ISSs”) el proceso de maduración. A estas regiones se unen las proteínas encargadas de llevar a cabo el procesamiento del pre-mRNA. En nuestro estudio, la mayoría de las variantes intrónicas se han detectado en controles o caracterizado en RNA en otros estudios. Aquellas para las que no hay muchos datos bibliográficos, se encuentran muy alejadas de los extremos de los exones, por lo que en principio no deberían influir en el procesamiento, pero podrían afectar al punto de ramificación o a los potenciadores o silenciadores intrónicos.

En nuestro estudio la variante **IVS9+44A>G** apareció en un único paciente. En el BIC está registrada tres veces, pero no existen publicaciones en las que aparezca.

La variante **IVS17-53C>T** apareció en 18 pacientes (5,25% del total), está registrada dos veces en el BIC, y aparece en varios trabajos con frecuencia similar (Jara et al., 2006; Infante et al., 2006). En el trabajo de Konstantopoulou sólo dan importancia a las variantes que se encuentran en las 26 pares de bases hacia el 5' y 3' de los exones, por lo que esta no la analizan (Konstantopoulou et al., 2008).

La variante **IVS22+8T>C** apareció en un paciente de nuestra serie. Esta alteración, según el BIC, apareció con una frecuencia del 3% en 180 alelos afroamericanos pero no en 248 caucasianos (Beth Newman, BIC). En otro trabajo en afroamericanos aparece en 2 de 45 familias con cáncer hereditario pero no en 92 controles (Panguluri et al., 1999). Sería interesante respecto a esta alteración, disponer de datos sobre controles de otro origen étnico.

Por último, la variante **IVS24+36C>G** apareció en dos pacientes de nuestro estudio. Esta variante no está registrada en el BIC y fue descrita previamente por nuestro grupo (Salazar et al., 2006).

1.2.2 POLIMORFISMOS DE BRCA2

En BRCA2 encontramos en total 34 variantes neutrales: 11 mutaciones silenciosas, 9 cambios de aminoácido sin importancia clínica y 14 variantes intrónicas.

Tabla 50: Total de polimorfismos encontrados en BRCA2 en las 343 familias estudiadas.

TIPO DE MUTACIÓN	EXÓN	MUTACIÓN	CODON	EFEECTO EN LA PROTEÍNA	VECES EN BIC	N° Y PORCENTAJE DE FAMILIAS EN QUE APARECE
Mutaciones silenciosas	10	A1392T	388	V388V	No está	1 (0,29%)
	10	A1593G	455	S455S	7	22 (6,41%)
	11	T2457C	743	H743H	7	4 (1,17%)
	11	G3111A	961	Q961Q	4	3 (0,87%)
	11	A3624G	1132	K1132K	8	1 (0,29%)
	11	T4035C	1269	V1269V	3	10 (2,91%)
	11	G4296A	1356	L1356L	3	3 (0,87%)
	11	C4812T	1528	S1528S	2	1 (0,29%)
	11	C4527T	1733	S1733S	2	1 (0,29%)
	14	A7470G	2414	S2414S	10	96 (28%)
16	G7854A	2542	T2542T	No está	2 (0,58%)	
Cambios de aminoácido sin importancia clínica	10	A1093C	289	N289H	13	31 (9,04%)
	10	C1342A	372	N372H	9	48 (14%)
	10	C1379T	384	S384F	141	2 (0,58%)
	11	G3031A	935	D935N	105	1 (0,29%)
	11	A3199G	991	N991D	6	38 (11,08%)
	11	G4813A	1529	G1529R	74	1 (0,29%)
	20	T8731C	2835	S2835P	34	2 (0,58%)
	20	A8795C	2856	E2856A	185	2 (0,58%)
	22	G9079A	2951	A2951T	40	5 (1,46%)
Variantes intrónicas	5' UTR	IVS1-26G>A (190-26G>A)			No está	99 (28,86%)
	1	IVS2-7delT (296-7delT)			4	1 (0,29%)
	1	IVS2-60C>T (296-60C>T)			No está	15 (4,37%)
	6	IVS6+14C>T (744+14C>T)			No está	2 (0,58%)
	6	IVS6+54T>C (744+54T>C)			No está	1 (0,29%)
	8	IVS8+56C>T (909+56C>T)			1	45 (13,12%)
	10	IVS10+12delT (2137+12delT)			2	17 (5%)
	10	IVS11-20T>A (7070-20T>A)			5	1 (0,29%)
	14	IVS14+53C>T (7663+53C>T)			4	15 (4,37%)
	15	IVS16-14T>C (8034-14T>C)			15	45 (13,12%)
	23	IVS24-16T>C (9485-16T>C)			6	8 (2,33%)

	24	IVS25-12T>G (9730-12T>G)	2	1 (0,29%)
	25	IVS25+9A>C (9729+9A>C)	17	1 (0,29%)
	25	IVS25+166G>A (9729+166G>A)	No está	1 (0,29%)

Al igual que sucede con los polimorfismos de BRCA1, la mayoría de estas variantes de BRCA2 pueden ser clasificadas como neutrales gracias a los datos registrados en el BIC, los trabajos publicados al respecto, o a los resultados del presente estudio. En la tabla 51 se resumen estas variantes neutrales bien caracterizadas y las razones de su benignidad.

Tabla 51: Variantes neutrales bien caracterizadas de BRCA2 y razones que confirman su neutralidad.

VARIANTES SILENCIOSAS			
Exón	Mutación	Efecto en la proteína	Confirmación de su neutralidad
10	A1593G	S455S	Aparece en 2 de 200 controles (Boyd, BIC) y en 5 de 50 (Hadjisavvas et al., 2003). En nuestro estudio aparece junto a una patogénica: 3036delACAA en una familia.
11	T2457C	H743H	En Kim et al. aparece en el 16,8% de controles (Kim et al., 2006), En Wagner aparece en el 13% de controles de origen étnico global (Wagner et al., 1999).
11	G3111A	Q961Q	Aparece en un 0,6% de controles de origen étnico global (Wagner et al., 1999). En Infante aparece en 1 de 309 familias (Infante et al., 2006), y en nuestro estudio en 3 de 343, por lo que es una variante poco frecuente y por ello aparece en tan baja frecuencia en el trabajo de Wagner.
11	A3624G	K1132K	En Kim aparece en el 56,9% de los controles (Kim et al., 2006), y en Hadjisavvas en el 26% (Hadjisavvas et al., 2003). En Agalliu aparece en homocigosis (Agalliu et al., 2007).
11	T4035C	V1269V	Aparece también en el 56,9% de controles en Kim (Kim et al., 2006, y en el 57% en Hadjisavvas (Hadjisavvas et al., 2003). En Agalliu aparece en homocigosis (Agalliu et al., 2007).
11	C4527T	S1733S	Aparece en un 3,36% de controles de origen global (Wagner et al., 1999).
14	A7470G	S2414S	Aparece en controles en varios trabajos: 64,7% (Kim et al., 2006), 20% (Hadjisavvas et al., 2003). También aparece en homocigosis (Agalliu et al., 2007). En nuestro estudio aparece con una frecuencia alta (28%); y en dos familias junto a dos patogénicas: 8873delACCA y 9254delATCAT respectivamente.
CAMBIOS DE AMINOÁCIDO NEUTRALES			
Exón	Mutación	Efecto en la proteína	Confirmación de su neutralidad
10	A1093C	N289H	Frecuencia en controles: 11% (Hadjisavvas et al., 2003), 16% (Kawahara et al., 2004), 19,8% (Kim et al., 2006). También aparece en homocigosis (Agalliu et al., 2007). En nuestro estudio aparece junto a dos patogénicas: 3036delACAA y Q2858X.
10	C1342A	N372H	Frecuencia en controles: 22-27% (Healey et al., 2000), 26% (Spurdle et al., 2002), 25% (Hu et al., 2003), 26-27% en controles de ambos sexos (Menzel et al., 2004), 29% (Hughes et al., 2005), 27% (Cox et al., 2005), 28% (Ramus et al., 2008). En muchos de estos estudios comparan casos y controles y, o no sale significativo, o con una significación muy ajustada. En el trabajo de Wu estudian la conservación entre especies, la frecuencia en controles y hacen estudios funcionales. De todo ello concluyen que es neutral (Wu et al., 2005). En nuestro estudio aparece en un 14% de los pacientes y en uno de ellos junto a una patogénica (3036delACAA).
11	A3199G	N991D	Frecuencia en controles: 7% (Hadjisavvas et al., 2003); 18% (Kim et al.,

			2006), 5,6% (Debniak et al., 2008).
11	G4813A	G1529R	No segrega con la enfermedad y aparece junto a patogénicas (BIC). En Zhou, mediante métodos matemáticos concluyen que no se asocia con la enfermedad (Zhou et al., 2005). En nuestro estudio aparece junto a la patogénica Q2858X en una familia.
20	T8731C	S2835P	Aparece en 1 de 100 controles afroamericanos y en 6% del FHCRC . Además, no segrega con la enfermedad y aparece junto a patogénicas (BIC). En el trabajo de Karchin mediante métodos matemáticos también determinan que es neutral (Karchin et al., 2008).
20	A8795C	E2856A	En el estudio de Chenevix-Trench de segregación, aparición junto a patogénicas...etc. Concluyen que es neutral (Chenevix-Trench et al., 2006). En el de Karchin también resulta ser neutral (Karchin et al., 2008). En el ensayo funcional desarrollado por Kuznetsov et al. también es neutral (Kuznetsov et al., 2008). En nuestro estudio aparece junto a una patogénica: 8370del11.
22	G9079A	A2951T	En Deffenbaugh ven que tiene una frecuencia parecida en casos y controles, que aparece junto a patogénicas, que no segrega con la enfermedad en tres familias y que no está en un dominio funcional importante, por todo ello es neutral (Deffenbaugh et al., 2002).
VARIANTES INTRÓNICAS			
Intrón	Mutación	Confirmación de su neutralidad	
5' UTR	IVS1-26G>A (190-26G>A)	En nuestro estudio aparece con frecuencia alta: en el 29% de los pacientes, y en dos familias aparece junto a la patogénica 3036delACAA.	
1	IVS2-60C>T (296-60C>T)	En nuestro estudio aparece junto a la patogénica E49X en una familia.	
8	IVS8+56C>T (909+56C>T)	Aparece en el 34% (Hadjisavvas et al., 2003) y en el 4% (Kawahara et al., 2004) de controles. En nuestro estudio tiene una frecuencia relativamente alta: aparece en el 13% de los pacientes. En una familia aparece junto a la mutación patogénica 3036delACAA.	
10	IVS10+12delT (2137+12delT)	En Hadjisavvas tienen una frecuencia del 100% en controles (Hadjisavvas et al., 2003). En nuestro estudio aparece junto a la patogénica 3036delACAA en dos familias.	
14	IVS14+53C>T (7663+53C>T)	Frecuencia en controles: 11% (Hadjisavvas et al., 2003), 1% (Suter et al., 2004) y 19% (Kanaan et al., 2003).	
15	IVS16-14T>C (8034-14T>C)	Frecuencia en controles: 73% (Kawahara et al., 2004) y 51% (Hadjisavvas et al., 2003). En nuestro estudio aparece en el 13% de los pacientes.	
23	IVS24-16T>C (9485-16T>C)	Aparece en el 2% de controles en Claes. Además aparece junto a una patogénica en tres familias y en otra no segrega con la enfermedad (Claes et al., 2003). En nuestro estudio aparece junto a la patogénica 6503delTT en una familia.	
25	IVS25+9A>C (9729+9A>C)	En Claes analizan el RNA del portador de la variante y ven que no aparecen transcritos alternativos. En Campos también estudian el RNA y ven que el procesamiento es normal (Claes et al., 2003; Campos et al., 2003 (a)).	

Por otro lado, hay tres variantes silenciosas del estudio sobre las cuales no hay demasiados datos: La mutación A1392T (V388V) es de nueva descripción ya que no aparece en el BIC ni en la bibliografía. El análisis preliminar mediante ESEfinder muestra que no se produce cambio alguno en los potenciadores de la maduración al introducir esta variante, por lo que probablemente se trate de un polimorfismo poco frecuente. La variante G4296A (L1356L) apareció en tres de nuestros pacientes. La citan en dos artículos españoles, en el de Infante está en 4 de 309 familias; en el de Beristain en 1 de 236 pacientes pero en ningún

control de 130 (Infante et al., 2006; Beristain et al., 2007). El estudio mediante ESEfinder muestra que aparece un nuevo sitio ESE de unión a SRp40. Podríamos estar ante un polimorfismo poco frecuente propio de la población española, pero se impone un análisis del RNA para confirmar su neutralidad. La variante C4812T (S1528S) aparece registrada dos veces en el BIC, y ambas entradas son españolas. En la literatura aparece en el artículo de Diez en un 4% de las familias estudiadas (Diez et al., 2003).

Entre las variantes intrónicas nos topamos con el mismo problema que con las de BRCA1, ya que la mayoría están en zonas alejadas de los sitios clásicos de procesamiento y es difícil inferir sus consecuencias.

La variante IVS2-7delT apareció en uno de nuestros pacientes y es un caso controvertido según la literatura: en el trabajo de Koul et al. describen que produce la pérdida del exón 3, pero sin que cambie la fase de lectura (Koul et al., 1999), en el de Santarosa encuentran un transcrito normal y otro alternativo, tanto en controles sanos como en líneas celulares tumorales. Como no cambia la fase de lectura, en dicho estudio piensan que no es un cambio patogénico sino que tiene funciones reguladoras (Santarosa et al., 1999 (a)). En Diez arguyen que esta pérdida no afecta a la zona de unión a RAD51 ni a las señales de localización nuclear, pero que son necesarios más estudios para demostrar fehacientemente si estamos ante un polimorfismo benigno (Diez et al., 2007).

La variante IVS6+14C>T no aparece registrada en el BIC y solamente es citada en un artículo, donde la encuentran en una de 44 familias hispanas con cáncer hereditario (Torres et al., 2007).

Las variantes IVS6+54T>C y IVS25+166G>A no están registradas en el BIC ni en la bibliografía. Algo parecido ocurre con IVS11-20T>A, que está registrada 5 veces en el BIC pero no hay ningún trabajo donde la encuentren. Para estas variantes serán necesarios nuevos estudios para definir sus implicaciones.

La variante IVS25-12T>G también tiene referencias contradictorias: está registrada en el BIC dos veces como polimorfismo neutral. En el trabajo de Vehmanen et al. observan que

está en el sitio aceptor del exón 26, en el tracto conservado de pirimidinas, pero no pudieron confirmar su implicación en el procesamiento al carecer de RNA. Por otro lado, no la encontraron en 186 cromosomas control (Vehmanen et al., 1997). Esta variante también está entre las que de momento se admiten como polimorfismos pero habrá que esperar a estudios posteriores para tener pruebas reales.

Un caso particular entre los polimorfismos que hemos encontrado de BRCA2 lo constituyen las variantes C1379T (S384F) y G3031A (D935N). Estas alteraciones en un principio estaban registradas como variantes sin clasificar en el BIC, y entraron en nuestro estudio pormenorizado de algunas “UVs”. Gracias a los trabajos publicados, en las sucesivas actualizaciones del BIC se sumaron nuevos datos y estas variantes pasaron a considerarse polimorfismos neutrales. Por ello han pasado a estar en esta sección de nuestro estudio, ya que también han aparecido en los pacientes analizados. A continuación está el resumen de los resultados obtenidos al respecto.

La mutación S384F no apareció en nuestros 100 controles sanos escrutados. Al cambiar serina por fenilalanina, se sustituye un aminoácido hidrófilo por uno hidrofóbico, pero ninguno de ellos está cargado y el cambio no parece alterar gravemente la estructura tridimensional de la proteína. El cambio se localiza en un dominio de BRCA2 donde se produce la unión a la desacetilasa de histonas P/CAF. En los estudios “in silico” mediante polyphen, SIFT y pMUT, en los tres resulta posiblemente patogénica. Sin embargo, en el caso de las variantes de BRCA2, como el alineamiento se hace con pocas secuencias, el resultado no es tan fiable como en otros casos y resulta solamente orientativo. En el BIC describen que esta variante no segrega con la enfermedad, que no está conservada entre especies y que aparece junto a mutaciones patogénicas. En la literatura hay trabajos donde se confirman estos datos: En Wappenschmidt et al. observan que presenta segregación incompleta con la enfermedad, que aparece junto a patogénicas en 116 de 43029 pacientes y que no hay pérdida de heterocigosidad en dos de los pacientes (Wappenschmidt et al., 2005). En el trabajo de Chenevix-Trench realizan una aproximación similar y también concluyen que esta variante es benigna (Chenevix-Trench et al., 2006). Por todo ello, queda confirmado que estamos ante un polimorfismo.

En el caso de D935N, apareció en el 1% de nuestros controles sanos, dato que ya indica su carácter neutral; sin embargo, en el cambio de aspártico por asparagina se intercambia un aminoácido con carga negativa por uno polar sin carga, lo que podría repercutir en la estructura de la proteína. El residuo 935 de BRCA2 se encuentra muy conservado entre especies y se localiza en la zona de unión a RAD51, por lo que podría tratarse de un aminoácido importante. Tres de los programas utilizados predicen que esta variante es patógena (polyphen, SIFT y SNPs3d), y uno que es neutral (pMUT). El programa ESEfinder no encuentra ninguna alteración de los sitios ESE debida a esta variante. En el BIC describen que D935N en 12 de 20 familias no segrega con la enfermedad y que aparece en otros casos junto a tres patogénicas. En otros trabajos se confirma esto: aparece en un 0,6% de controles de origen étnico global (Wagner et al., 1999) y no segrega con la enfermedad (Beetstra et al., 2006). Por lo que valorando los datos disponibles pesan más los que reivindican su neutralidad.

1.3 VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO

1.3.1 VARIANTES “UV” ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE PACIENTES

El estudio de 343 familias mostró 31 variantes sin clasificar, en concreto, 16 en BRCA1 y 15 en BRCA2. Todas las variantes “UV” encontradas son cambios de aminoácido puntuales. Cabe destacar que cuatro de ellas (L771S en BRCA1, y K426T, P458T y I1000L en BRCA2) son de nueva descripción.

La mayoría de las mutaciones UV suelen acabar siendo incluidas en el grupo de polimorfismos poblacionales, pero demostrar el significado funcional y clínico de una mutación con certeza es muy costoso. Las consecuencias funcionales de estas variantes se ignoran, lo cual impide en muchas ocasiones obtener un resultado informativo en el análisis genético. En la mayoría de los trabajos publicados estas variantes simplemente se citan como presentes en la población analizada, pero en pocas ocasiones se someten a un estudio exhaustivo. En los últimos cuatro años, se han publicado varios trabajos donde desarrollan algoritmos matemáticos que agrupan los datos sobre segregación con la enfermedad,

aparición junto a mutaciones patogénicas, presencia en controles, conservación entre especies, pérdida de heterocigosidad...etc. para intentar una clasificación. También hay estudios en que además de los datos mencionados, analizan el impacto en la estructura de la proteína, el cambio de aminoácido, o ensayos funcionales que determinan si cambia la localización subcelular de la proteína o sus niveles de expresión, o si alguna de sus funciones se ve comprometida por la presencia de la variante (Abkevich et al., 2004; Mirkovic et al., 2004; Figge et al., 2004; Wu et al., 2005; Chenevix-Trench et al., 2006; Phelan et al., 2006; Tavtigian et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Karchin et al., 2007; Lee et al., 2008; Farrugia et al., 2008; Spearman et al., 2008; Plon et al., 2008). El problema con los ensayos funcionales es su coste económico, duración y laboriosidad. Dos trabajos muy recientes desarrollan un ensayo funcional relativamente sencillo en el que intentan facilitar la esta clasificación funcional de variantes “UV” (Caligo et al., 2008; Kuznetsov et al., 2008).

Podemos resaltar algunas de las variantes encontradas en nuestros pacientes sobre las cuales existen datos a favor de la neutralidad gracias a los estudios publicados al respecto (tabla 52).

Tabla 52: Algunas de las variantes UV encontradas en BRCA1 y datos publicados que apoyan su neutralidad.

Mutación	Efecto en la proteína	Datos a favor de la neutralidad
C2121T	L668F	Aparece junto a una patogénica en un trabajo (Eng et al., 2001)
G3143A	M1008I	Aparece en trans junto a mutaciones patogénicas, tanto en heterocigosis como en homocigosis (Judkins et al., 2005 (a)) y en casos ashkenazi aparece de forma recurrente junto a una misma patogénica (Tavtigian et al., 2006).
G3238A	S1040N	No aparece con pérdida de heterocigosidad (de la Hoya et al., 1999) y no segrega con la enfermedad (Durocher et al., 1996); además aparece en controles (Arnold et al., 2002; Durocher et al., 1996).
A4158G	R1347G	Está en controles, no segrega con la enfermedad y no es un residuo conservado (Deffenbaugh et al., 2002).
C4380T	H1421Y	En el estudio funcional de Phelan obtiene los mismos niveles de activación de la transcripción que la proteína germinal (Phelan et al., 2005). En otro estudio funcional ven que la expresión de BRCA1 con la mutación es parecida al germinal, que mantiene la afinidad por JunB y que es capaz de activar la

		transcripción (Hu et al., 2002).
G5075A	M1652I	Aparece en controles: 4,8% (Arnold et al., 2002), 4,08% (Deffenbaugh et al., 2002), 8,3% (Saxena et al., 2006). Además, en el estudio de Gough ven que cuando BRCA1 porta esta variante mantiene su estructura cristalina y la capacidad de unión a BACH1 (Gough et al., 2007).

El resto de variantes de significado desconocido encontradas en BRCA1 no pueden clasificarse, a la espera de más datos.

Entre las variantes “UV” encontradas en BRCA2, algunas también han sido estudiadas por otros grupos y existen datos a favor de su neutralidad (tabla 53).

Tabla 53: Algunas de las variantes UV encontradas en BRCA2 y datos publicados que apoyan su neutralidad.

Mutación	Efecto en la proteína	Datos a favor de la neutralidad
A353G	Y42C	Aparece en controles, junto a patogénicas y no segrega con la enfermedad (Chenevix-Trench et al., 2006). En Simard también la encuentran junto a una patogénica (Simard et al., 2007). En el estudio funcional de Wu observan que la proteína cuando porta la variante sigue siendo nuclear, las células son viables frente a agentes que dañan el DNA y la recombinación homóloga es normal (Wu et al., 2005). En otro ensayo funcional reciente también la clasifican como neutral (Kuznetsov et al., 2008).
T5972C	T1915M	Aparece en controles: 5% (Goode et al., 2002), 6,8% (Johnson et al., 2007), 6,1% (Debniak et al., 2008). En nuestro estudio aparece junto a dos patogénicas: 8370del11 y Q2858X.
C7625T	A2466V	Tiene una proporción similar en casos y controles afroamericanos (Freedman et al., 2004), y una frecuencia del 1,8% en controles de origen étnico global (Wagner et al., 1999).
T9520C	Y3098H	Analizando la conservación entre especies y el cambio en la estructura de la proteína concluyen que es neutral (Karchin et al., 2008).
A10462G	I3412V	Aparece con la misma frecuencia en casos y controles multiétnicos (Freedman et al., 2004). Aparece junto a una

		patogénica (Wárlám-Rodenhuis et al., 2005) y tiene segregación incompleta con la enfermedad (Inoue et al., 1997).
--	--	--

Algunas de las variantes sin clasificar encontradas en BRCA2 han sido estudiadas por nosotros en más profundidad.

1.3.2 ANÁLISIS PORMENORIZADO DE ALGUNAS VARIANTES “UV” DEL GEN BRCA2

Se han estudiado 12 variantes de significado desconocido localizadas en el gen BRCA2. Tras el estudio de diversos factores, hemos clasificado como claramente neutrales algunas de ellas, y, como posiblemente patogénicas otras.

A) VARIANTES QUE PUEDEN CONSIDERARSE NEUTRALES:

Durante la realización de este trabajo algunas variantes han pasado a considerarse polimorfismos neutrales en el BIC debido a la aportación de nuevos datos. Ya hemos comentado sobre las mutaciones S384F y D935N en la sección de polimorfismos (página). También las mutaciones A2717S y K3326X se han reclasificado recientemente como variantes neutrales:

- La variante **G8377T (A2717S)** se localiza en el exón 18 de BRCA2. En nuestro estudio algunos datos las señalan como variante neutral: no está conservada entre especies y todos los programas de predicción utilizados la catalogan como neutral. Por el contrario, no apareció en nuestra serie de 100 controles sanos y se encuentra en el dominio de unión a DSS1, región importante para la función en reparación de DNA de BRCA2. Además, cambia el tipo de aminoácido, de uno hidrofóbico a uno polar sin carga, lo que podría alterar la estructura de la proteína. En la bibliografía esta variante no aparece en controles (Meindl, German Consortium for HBOC, 2002), pero encontramos que aparece con frecuencia baja en pacientes con cáncer de mama,

ovario y próstata (Edwards et al., 2003; Lubinski et al., 2004; Simard et al., 2007). Mediante métodos matemáticos integrando los resultados de diversas fuentes la clasifican como neutral (Karchin et al., 2008). En el BIC existen más de 30 registros sobre esta mutación, con origen étnico predominantemente de Europa oeste, judíos ashkenazi y latinos. Remarcan que no segrega con la enfermedad en 10 de 16 familias y que aparece en “trans” junto a cuatro patogénicas. Por estos datos de es reclasificada en el BIC como neutral, a pesar de que no haya muchos estudios al respecto.

- Respecto al caso particular de la mutación sin sentido **A10204T (K3326X)**, existen numerosos trabajos en que se demuestra que a pesar de producir una proteína truncada, como está muy hacia el final de la misma no altera la funcionalidad de BRCA2. En nuestro estudio aparece en el 2% de los controles sanos, y en otros trabajos también la encuentran en población control (Hadjisavvas et al., 2004; Martin et al., 2005; Beristain et al., 2007). Además, en varios estudios y entradas del BIC aparece junto a mutaciones patogénicas (Claes et al., 2003; Beristain et al., 2007; BIC).

Entre el resto de las variantes estudiadas, a pesar de que en el BIC siguen catalogadas como “de significado desconocido”, hay algunas que gracias a nuestros resultados y los datos publicados podemos clasificarlas como neutrales:

- **G677A (H150R):**

Esta variante no se encuentra conservada entre especies, no se localiza en ningún dominio funcional importante, y en cuanto al cambio de histidina por arginina, ambos son aminoácidos con carga positiva, por lo que la repercusión en la estructura proteica no sería muy importante. Los programas SIFT y pMUT la clasifican como neutral. El programa ESEfinder predecía la aparición de un nuevo sitio potenciador del procesamiento, así como la disminución de la afinidad de uno ya existente por las proteínas SRP. Sin embargo, cuando en este caso analizamos experimentalmente el RNA del paciente portador de esta variante, comprobamos que presentaba un procesamiento totalmente normal, sin transcritos anómalos. Por ello debemos tomar con cautela los resultados de los programas de predicción, que pueden detectar falsos

positivos. Esta variante no está registrada en el BIC y, hasta la fecha, tan solo se ha citado en un artículo de nuestro grupo (Salazar et al., 2006). Por ello, estos son los primeros datos que la clasifican como polimorfismo.

- **A3398G (K1057R):**

Esta variante no se encuentra conservada entre especies, y el cambio de lisina por arginina no debería alterar la estructura de la proteína, ya que son ambos aminoácidos con carga positiva y propiedades similares. Los cuatro programas de predicción utilizados la clasifican como neutral, y, a pesar de que el programa “ESEfinder” predice dos nuevos potenciadores de maduración, sin la confirmación experimental a nivel de RNA debemos tomar ese dato como una simple predicción. Por otro lado, esta mutación se localiza en una de las zonas de interacción con RAD51, sin embargo, no se encuentra en las repeticiones BRC, sino en la región espaciadora entre el primer y segundo BRC. Por lo que no forma parte de las zonas de BRCA2 que realmente interaccionan y regulan a RAD51. No existen otros trabajos donde se analice su presencia en controles, y en el BIC la única entrada es la registrada por nuestro grupo (Diez et al., 2003; Salazar et al., 2006). Probablemente estemos ante un polimorfismo poco frecuente y haya que aumentar el número de controles para poder detectarlo.

- **C6328T (R2034C):**

Esta variante apareció en el 4% de los 100 controles analizados en nuestro estudio. Por otro lado, este residuo no está conservado entre especies ni se encuentra en un dominio funcional importante de BRCA2. A pesar de que cambia un aminoácido cargado positivamente por uno polar sin carga, de que tres de los cuatro programas de predicción la clasifican como patogénica, y de que podría cambiar los potenciadores de maduración, debido a su alto porcentaje en controles nos inclinamos a pensar que estamos ante una variante neutral. En la literatura aparece esta variante en numerosos artículos, incluyendo algunos españoles (Diez et al., 2003; Velasco et al., 2005; Infante et al., 2006; Van der Hout et al., 2006; Frosk et al., 2007; Miramar et al., 2008). En el trabajo de Deffenbaugh observan que esta variante no segrega con la enfermedad y aparece junto a mutaciones patogénicas (Deffenbaugh et al., 2002). En otro trabajo también aparece en controles, pero con una frecuencia mucho menor que

en nuestro estudio. A pesar de tratarse también de un estudio español, esta variabilidad podría deberse a diferencias entre las distintas regiones (Healey et al., 2000; Beristain et al., 2007). En un artículo reciente integran matemáticamente datos similares a los nuestros (conservación, aparición junto a patogénicas, pérdida de heterocigosidad...etc.) y también concluyen que es una variante neutral (Spearman et al., 2008).

- **A8746G (I2840V):**

En esta variante se da la particularidad de que entre las distintas especies analizadas en el alineamiento, en la posición correspondiente al 2840, en gallo aparece una valina. Esto quiere decir que ese aminoácido ya había aparecido en la evolución y da lugar a una proteína funcional. Por lo que esa variante debe ser neutral. Además, isoleucina y valina son ambos aminoácidos hidrofóbicos y tres de los programas de predicción clasifican esta variante como neutral. A pesar de que el programa “ESEfinder” predecía la aparición de un nuevo potenciador de maduración y el aumento de la afinidad de uno preexistente por SRp55, el análisis del RNA del paciente portador de esta variante mostró un procesamiento absolutamente normal. Un último dato que despeja cualquier duda sobre la neutralidad de esta variante lo constituye el hecho de que aparece junto a una mutación patogénica (8873delACCA) en una de las familias estudiadas. En conclusión, esta variante tiene datos más que suficientes para ser considerada un polimorfismo.

B) VARIANTES CON POSIBLE EFECTO PATOGENICO:

Para algunas de las variantes analizadas no ha sido posible llegar a una conclusión definitiva:

- La alteración **D244N** no se localiza en ningún dominio funcional, no cambia los sitios “ESE” según el programa “ESEfinder” y el programa pMUT la califica de neutral, todo lo cual apoyaría su neutralidad. Pero, por otro lado, no aparece en controles, está conservada entre especies y cambia un aminoácido con carga negativa a uno polar sin carga, lo que podría alterar la estructura de la proteína. Además, los programas SIFT y POLYPHEN realizan una predicción negativa y no aparece junto a mutaciones

patogénicas. En la bibliografía encontramos un artículo donde esta variante aparece en una familia con más de dos individuos afectados de cáncer de mama y cuya probabilidad estimada de encontrar una alteración era de 0,74 (Peixoto et al., 2006). Serán necesarios más estudios para determinar las consecuencias de esta variante sobre la funcionalidad de BRCA2.

- La mutación **P375S** no está en un residuo conservado y el programa pMUT la califica de neutral, pero todos los demás datos apoyan su patogenicidad: está en el dominio de unión a P/CAF, no aparece en controles, según “ESEfinder” produce la aparición de tres nuevas secuencias potenciadoras del procesamiento del RNA y el resto de los programas de predicción la clasifican como patogénica. En la bibliografía no hay ningún trabajo donde se cite esta variante aparte del publicado por nuestro grupo (Salazar et al., 2006). Se necesitaría ampliar el grupo de controles estudiados, analizar las posibles consecuencias de este cambio sobre la maduración del RNA y determinar si altera la unión de BRCA2 a la desacetilasa de histonas P/CAF.
- La variante **W395G**, no está en un residuo conservado, y el programa SIFT la califica de neutral. Sin embargo el resto de datos apoyan su patogenicidad: No aparece en controles, cambia un aminoácido hidrofóbico por uno polar sin carga, se encuentra en el dominio de unión a P/CAF, POLYPHEN y pMUT la clasifican como patogénica, y según “ESEfinder” al introducir esta variante desaparece un sitio de unión a la proteína de procesamiento SRp40. En el BIC aparecen 6 registros de esta alteración, procedentes de individuos de origen étnico diverso: latinos, europeos caucásicos y nativos americanos, pero, en ninguno de los registros hay información adicional disponible. En cierto trabajo aparece esta variante en uno de 110 pacientes de origen hispano, pero no realizan ninguna aproximación para clasificarla (Weitzel et al., 2005). Gracias a que disponemos en nuestro laboratorio del RNA del paciente portador de esta variante, procederemos a comprobar si se altera el procesamiento, y, mediante la clonación del fragmento de la proteína que contiene el cambio en un vector de expresión, intentaremos mostrar si se alteran los niveles de la proteína y su unión a P/CAF. En resultados preliminares hemos observado que los niveles de

expresión de la proteína germinal y la alterada son similares. En futuros estudios se clarificarán las consecuencias funcionales de esta variante.

- En el caso de **E3002K**, no se encuentra en ningún dominio importante de BRCA2 y el programa POLYPHEN la clasifica como neutral, pero el resto de resultados apoyan posible calidad de patogénica: el cambio de un aminoácido con carga negativa por uno con carga positiva puede alterar gravemente la estructura de la proteína. A pesar de no estar en un dominio funcional importante, un cambio en la estructura podría repercutir en la conformación del resto de la cadena polipeptídica. Por otro lado, se trata de un residuo conservado, no aparece en controles ni junto a mutaciones patogénicas y tres de los cuatro programas de predicción sugieren un efecto patogénico. Además, según el programa “ESEfinder” provoca la desaparición de dos secuencias de interacción con SF2/ASF. En la bibliografía solo aparece el artículo de nuestro grupo (Salazar et al., 2006).

Por las razones expuestas, serán necesarios nuevos estudios para poder clasificar estas cuatro variantes de forma definitiva.

Las mutaciones UV son un problema común en el diagnóstico genético en general, pero son especialmente problemáticas en BRCA1/2 dado el gran tamaño de estos genes y la profusión con que aparecen: en nuestro estudio de 343 pacientes, un 28% de las mutaciones encontradas fueron “variantes sin clasificar”. Los factores que nos aproximan al significado clínico de una mutación UV pueden ser de ayuda a la hora de aconsejar a los individuos portadores (Wu et al., 2005; Chenevix-Trench et al., 2006; Karchin et al., 2008). A pesar de las dificultades, la clasificación de estas variantes UV tiene un gran significado clínico para las familias portadoras de las mismas.

En las tablas 54 y 55 se resumen los resultados obtenidos en este estudio pormenorizado de variantes de significado desconocido y la clasificación a la que hemos llegado.

Tabla 54: Resultados sobre frecuencia en controles, conservación, localización en la proteína y tipo de cambio de aminoácido que se produce con cada una de las variantes estudiadas.

Exón	Mutación	Efecto en la proteína	Presencia en controles	Conservación entre especies	Localización en dominio Funcional	Tipo de cambio de aminoácido	
5	G677A	H150R	No	No	No	No cambia	
9	G958A	D244N	No	Si	No	carga negativa	Polar sin carga
10	C1351T	P375S	No	No	Sitio de unión a P/CAF	Hidrofóbico	Polar sin carga
10	C1379T	S384F	No	No	Sitio de unión a P/CAF	Polar sin carga	Hidrofóbico
10	T1411G	W395G	No	No	Sitio de unión a P/CAF	Hidrofóbico	Polar sin carga
11	G3031A	D935N	1%	Si	Sitio de unión a RAD51	Carga negativa	Polar sin carga
11	A3398G	K1057R	No	No	Sitio de unión a RAD51	No cambia	
11	C6328T	R2034C	4%	No	No	carga positiva	polar sin carga
18	G8377T	A2717S	No	No	Sitio de unión a DSS1	Hidrofóbico	Polar sin carga
20	A8746G	I2840V	No	No, V en gallo	Sitio de unión a DSS1	No cambia	
23	G9232A	E3002K	No	Si	No	carga negativa	carga positiva
27	A10204T	K3326X	2%	-	Zona DBD	-	

Tabla 55: Resultados de los estudios “in silico”, así como el análisis del procesamiento del RNA en aquellos casos que fue posible, presencia junto a mutaciones patogénicas y clasificación a la que hemos llegado teniendo en cuenta todos los datos.

Exón	Mutación	Efecto en la proteína	Programas predicción*					Análisis RNA	Presencia junto a patogénicas	CLASIFICACIÓN
			Polyphen	SIFT	SNPs3d	pMUT	ESEfinder			
5	G677A	H150R	P	N	-	N	Cambia	Normal	No	Neutral
9	G958A	D244N	P	P	-	N	No cambia	-	No	Posiblemente patogénica
10	C1351T	P375S	P	P	-	N	Cambia	-	No	Posiblemente patogénica
10	C1379T	S384F	P	P	-	P	Cambia	-	No	Neutral
10	T1411G	W395G	P	N	-	P	Cambia	-	No	Posiblemente patogénica
11	G3031A	D935N	P	P	P	N	No cambia	-	No	Neutral
11	A3398G	K1057R	N	N	N	N	Cambia	-	No	Neutral
11	C6328T	R2034C	N	P	P	P	Cambia	-	No	Neutral
18	G8377T	A2717S	N	N	N	N	Cambia	-	No	Neutral
20	A8746G	I2840V	N	P	N	N	Cambia	Normal	Si	Neutral
23	G9232A	E3002K	N	P	P	P	Cambia	-	No	Posiblemente patogénica
27	A10204T	K3326X	-	-	-	-	No cambia	-	No	Neutral

* P:patogénica, N:neutral.  :Demostrada su neutralidad en la bibliografía.

2.- GRANDES REESTRUCTURACIONES EN BRCA1 Y BRCA2

Las mutaciones germinales puntuales en BRCA1 y BRCA2 detectadas habitualmente suponen un porcentaje menor del esperado según las estimaciones de los análisis de ligamiento (Szabo et al., 1997). Este hecho puede explicarse en parte porque hay alteraciones que escapan a los métodos habituales de detección de mutaciones puntuales (Puget et al., 2002). Estas alteraciones son los grandes reordenamientos que provocan la pérdida o ganancia de partes grandes de un gen y la aparición de proteínas aberrantes (Woodward et al.,

2005; Mazoyer et al., 2005). La proporción de este tipo de alteraciones en familias con una historia familiar fuerte de cáncer de mama y/o ovario hereditario varía entre el 0,8 y el 23% según las distintas poblaciones, lo que constituye entre un 8 y un 40% del espectro mutacional en los distintos grupos étnicos (Montagna et al., 2003; Petrij-Bosch et al., 1997; Gad et al., 2002; Belogianni et al., 2004; de la Hoya et al., 2006).

Realizamos la búsqueda de reordenamientos de BRCA1 en 60 pacientes, y de BRCA2 en 20. Estos pacientes fueron seleccionados entre aquellos con un resultado negativo en el análisis de mutaciones puntuales, y, en concreto, aquellos con tres o más casos de cáncer de mama y/o ovario en la familia, o los probandos con aparición de cáncer a edades muy tempranas. Cada estudio se realizó por triplicado, conociendo la alta proporción de falsos positivos de la técnica MLPA. De hecho, al analizar mediante RT-PCR otros dos pacientes con picos alterados en el MLPA obtuvimos una secuencia totalmente normal, por lo que hay que ser cuidadosos al interpretar los resultados de esta técnica.

Tan solo un reordenamiento pudo ser confirmado mediante RT-PCR en el RNA del paciente y mediante PCR normal en su DNA genómico. Esto constituye un 1,25% de reestructuraciones entre los 80 pacientes analizados.

Esta alteración supone la pérdida del exón 14, mencionada en el apartado de resultados. Esta única reestructuración confirmada en nuestra población no aparece en la base de datos HGMD ni en la bibliografía, por lo que es de nueva descripción. Esta pérdida provoca la aparición de un codon de parada prematuro en el exón 15 y la generación de una proteína trunca. El reordenamiento se lleva a cabo a través de la pérdida del exón 14 (y parte de los intrones 13 y 14) y la inserción de una secuencia Alu en el punto de rotura. Las secuencias Alu se han relacionado en otros trabajos con este tipo de reordenamientos. Esta reestructuración apareció en una familia cuyo probando había sido diagnosticada de cáncer de mama y ovario a los 57 y 58 años respectivamente. La mutación provenía de la línea paterna y entre sus familiares había otros 4 casos de cáncer de ovario, uno de ellos en un pariente de primer grado.

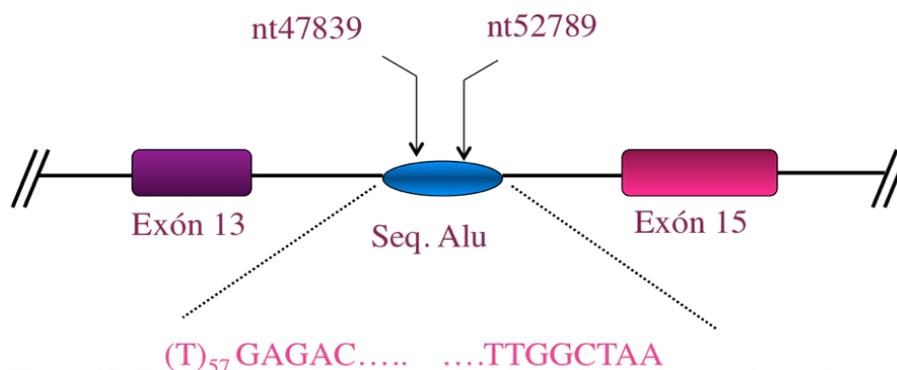


Figura 37: Esquema que representa el reordenamiento encontrado en el probando. Observamos los puntos de rotura y la secuencia Alu que se inserta.

En población española, aún no existen muchos reordenamientos confirmados fehacientemente, ya que a veces no se dispone de RNA de los pacientes, o de otras técnicas con que corroborar los resultados obtenidos mediante MLPA. Por otro lado, la proporción de reestructuraciones varía de unos estudios a otros debido en parte a las técnicas de detección (de la Hoya et al., 2006; Bellosillo et al., 2006; Gutiérrez Enríquez et al., 2007; Palanca et al., 2008).

CONCLUSIONES

1.- El 32% de la población estudiada porta una o más alteraciones en BRCA1 y BRCA2. Dentro de este grupo, un 9% presentan una mutación patogénica. De entre las alteraciones patogénicas, 6 son descritas por primera vez a nivel mundial en nuestro estudio. Estos resultados justifican el desarrollo del Programa de Consejo Genético en Cáncer Hereditario.

2.- La tasa de mutaciones patogénicas detectadas es menor que la publicada hasta el momento debido, posiblemente a que algunas de las familias estudiadas no cumplían estrictamente los criterios de inclusión en el programa. Sin embargo, debemos señalar que dentro de las familias sin criterios estrictos, hemos encontrado dos portadoras de mutaciones patogénicas que se han favorecido del Programa de Consejo Genético en Cáncer Hereditario.

3.- Las mutaciones patogénicas 1793delA, 2031delG, C1806T (Q563X), G5236A (G1706E) y C5242A (A1708E) de BRCA1, y 3036delACAA de BRCA2, aparecen de forma recurrente en nuestra población y podrían tener un efecto fundador en Castilla y León.

4.- Un 28% de las mutaciones encontradas se consideraron variantes de significado desconocido. Tras el análisis, hemos clasificado dos terceras partes de las variantes estudiadas como polimorfismos neutrales y un tercio como posiblemente patogénicas. En referencia a estas últimas, se requieren más estudios de para confirmar su inclusión en este grupo.

5.- Por primera vez describimos un reordenamiento del gen BRCA1 que supone la pérdida del exón 14 y de las secuencias intrónicas flanqueantes, mediado por la inserción de una secuencia Alu. Este hallazgo justifica la necesidad de completar el estudio mediante técnicas como MLPA en pacientes con criterios de inclusión en el Programa que no sean portadores de mutaciones puntuales.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abkevich V., Zharkikh A., Deffenbaugh A. M. Et al., “Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation”, *J. Med. Genet.* 41(7):492-507, 2004.

Agalliu I., Kwon E. M., Zadory D. Et al., “Germline mutations in the BRCA2 gene and susceptibility to hereditary prostate cancer”, *Clin. Cancer Res.* 13(3):839-43, 2007.

Akbari M. R., Malekzadeh R., Nasrollahzadeh D. Et al., “Germline BRCA2 mutations and the risk of esophageal squamous cell carcinoma”, *Oncogene* 27(9):1290-6, 2008.

Anderson G. L., Limacher M., Assaf A. R., et al., “Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women’s Health Initiative randomized controlled trial”, *JAMA* 291:1701-1712, 2004.

Antoniou A., Pharoah P. D., Narod S. et al., “Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies”, *Am. J. Hum. Genet.* 72:1117-1130, 2003.

Armes J. E., Egan A. J., Southey M. C. et al., “The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population- based study”, *Cancer.* 83:2335–2345, 1998.

Arnold N., Peper H., Bandick K. Et al., “Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography”, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 782(1-2):99-104, 2002.

Augello C., Bruno L., Bazan V. Et al., “Y179C, F486L and N550H are BRCA1 variants that may be associated with breast cancer in a Sicilian family: results of a 5-year GOIM (Gruppo Oncologico dell’Italia Meridionale) prospective study”, *Ann. Oncol.* 17 Suppl 7:vii30-3, 2006

Auranen A., Song H., Waterfall C. et al., “Polymorphisms in DNA repair genes and epithelial ovarian cancer risk”, *Int. J. Cancer.* 117(4):611-8, 2005.

B

Baer R., Ludwig T., “The BRCA1-BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin ligase activity”, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12(1):86-91, 2002.

Baeyens A., Thierens H., Claes K. Et al., “Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation Carriers”, *Int. J. Radiat. Biol.* 80(10):745-56, 2004.

Bane A. L., Beck J. C., Bleiweiss I. Et al., “BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays”, *Am J Surg Pathol* 31(1):121-128, 2007.

Barker D. F., Almeida E. R., Casey G. Et al., “BRCA1 R841W: a strong candidate for a common

mutation with moderate phenotype”, *Genet. Epidemiol.* 13(6):595-604, 1996.

Basham V. M., Lipscombe J. M., Ward J. M. Et al., “BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer”, *Breast Cancer Res.* 4(1):R2, 2002.

Baudi F., Grandinetti C., Quaresima B. Et al., “A new L771L polymorphism in the BRCA1 gene frequently found in Southern Italy”, *Hum. Mut. Mutation and polymorphism report* 33, 1998.

Bellosillo B., Tusquets I., “Pitfalls and caveats in BRCA sequencing”, *Ultrastruct. Pathol.* 30(3):229-35, 2006

Belogianni I., Apeessos A., Mihalatos M. Et al., “Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer”, *BMC Cancer.* 4:61, 2004.

Beetstra S., Salisbury C., Turner J. Et al., “Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers, with or without breast cancer, are not abnormally sensitive to the chromosome damaging effect of moderate folate deficiency”, *Carcinogenesis* 27(3):517-24, 2006.

Beral V., “Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease”, *The lancet* 360:187-195, 2002.

Beral V., Bull D., Reeves G., “Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the million women study”, *Lancet* 365:1543-1551, 2005.

Berclaz G., Li S., Price K. N. et al., “Body mass index as a prognostic feature in operable breast cancer: the internacional breast cancer study group experience”, *Annals of oncology* 15:875-884, 2004.

Bergthorsson J. T., Ejlersen B., Olsen J. H. Et al., “BRCA1 and BRCA2 mutation status and cancer family history of Danish women affected with multifocal or bilateral breast cancer at a young age”, *J. Med. Genet.* 38(6):361-8, 2001.

Beristain E., Martínez-Bouzas C., Guerra I. Et al., “Differences in the frequency and distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer cases from the Basque country with respect to the Spanish population: implications for genetic counselling”, *Breast Cancer Res. Treat.* 106(2):255-62, 2007.

Berkey C. S., Frazier A. L., Gardner J. D., Colditz G. A., “Adolescence and breast carcinoma risk”, *Cancer*, 85:2400-2409, 1999.

Bernstein L., “Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer”, *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 7:3-15, 2002.

Berx G., Cleton-Jansen A. M., Strumane K. Et al., “E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain”, *Oncogene* 13:1919-1925, 1996.

Bhattacharyya A., Ear U. S., Koller B. H., Weichselbaum R. R., Bishop D. K., “The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin”, *J. Biol. Chem.* 275(31):23899-903, 2000.

Birch J., Hartley A., Tricker K. Et al., "Prevalence and Diversity of constitutional mutations in p53 gene among 21 Li-Fraumeni families", *Cancer Res.* 54:1298-1304, 1994.

Blesa J. R., García J. A., Ochoa E., "Frequency of germ-line BRCA1 mutations among Spanish families from a Mediterranean area", *Hum. Mutat.* 15(4):381-2, 2000.

Boardman L. A., Thibodeau S. N., Schaid D. J. Et al., "Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome", *Ann. Intern. Med.* 128:896-899, 1998.

Bochar D. A., Wang L., Beniya H. Et al., "BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer", *Cell* 102:257-265, 2000.

Bogdanova N., Enssen-Dubrowskaja N., Feshchenko S. et al., "Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer", *Int. J. Cancer* 111:543-547, 2005.

Bogliolo M., Lyakhovich A., Callén E. et al., "Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability", *EMBO J.* 26(5):1340-51, 2007.

Borresen A. L., Andersen T. I., Garber J. Et al., "Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients", *Cancer Res.* 52:3234-3236, 1992.

Boyd N. F., Byng J. W., Jong R. A. et al., "Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Cancer Screening Study", *J. Natl. Cancer Inst.* 87:670-675, 1995.

Boyd N. F., Stone J., Vogt K. N., et al., "Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature", *Br. J. Cancer* 89:1672-1685, 2003.

Boyd N. F., Guo H., Martin L. et al., "Mammographic density and the risk and detection of breast cancer", *N. Engl. J. Med.* 356:227-236, 2007.

The Breast Cancer Association Consortium Commonly, "Studied Single-Nucleotide Polymorphisms and Breast Cancer: Results From the Breast Cancer", Association Consortium, *J. Natl. Cancer Inst.*, 98(19), 2006 .

Brincat M., Muscat Baron Y., Ciantar E., "Hormone replacement in women with breast cancer: the HABITS study", *Endocrine* 24:255-257, 2004.

Brinton L. A., Daling J. R., Liff J. M. Et al., "Oral contraceptives and breast cancer risk among younger women", *J. Natl. Cancer Inst.* 87:827-835, 1995.

Brinton L. A., Hoover R., Haile R., "Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status", *J. Natl. Cancer Inst.* 87:1622-1629, 1995.

Brinton L. A., Schairer C., Hoover R. N., Fraumeni J. F. Jr., "Menstrual factors and risk of breast cancer", *Cancer Invest.* 6:245-254, 1988.

Brozek I., Ochman K., Debniak J. Et al., "High frequency of BRCA1/2 germline mutations in consecutive ovarian cancer patients in Poland", *Gynecol. Oncol.* 108(2):433-7, 2008.

Brzovic P.S., Keefe J. R., Nishikawa H. et al., "Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1-BARD1 ubiquitin-ligase complex", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(10):5646-5651, 2003.

Buck M. "A novel domain of BRCA1 interacts with p53 in breast cancer cells", *Cancer Lett.* 268(1):137-45, 2008.

C

Caldes T., de la Hoya M., Tosar A. et al., "A breast cancer family from Spain with germline mutations in both the BRCA1 and BRCA2 genes", *J. Med. Genet.* 39(8):e44, 2002.

Caligo M. A., Bonatti F., Guidugli L., Aretini P., Galli A., "A yeast recombination assay to characterize human BRCA1 missense variants of unknown pathological significance", *Hum. Mutat.* 2008 [Epub ahead of print]

Calle E. E., Rodríguez C., Walker-Thurmond K., Thun M. J., "Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults", *N. Engl. J. Med.* 348:1625-1638, 2003.

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

Campos B., Diez O., Domènech M. Et al., "BRCA2 mutation analysis of 87 Spanish breast/ovarian cancer families", *Ann. Oncol.* 12(12):1699-703, 2001.

Campos B., Díez O., Domènech M. Et al., "RNA analysis of eight BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from Spain", *Hum. Mutat.* 22(4):337, 2003. (a)

Campos B., Díez O., Odefrey F. Et al., "Haplotype analysis of the BRCA2 9254delATCAT recurrent mutation in breast/ovarian cancer families from Spain", *Hum. Mut.* 21:452, 2003. (b)

Carroll B. T., Couch F. J., Rebbeck T. R., Weber B. L., "Polymorphisms in PTEN in breast cancer families", *J. Med. Genet.* 36:94-96, 1999.

Carroll K. K., Gammal E. B., Plunkett E. R., "Dietary fat and mammary cancer", *Can. Med. Assoc. J.* 98:590-594, 1968.

Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M. Q., Krainer A. R., "ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers", *Nucleic Acids Res.* 31:3568-3571, 2003.

Carvalho M. A., Marsillac S. M., Karchin R. Et al., "Determination of cancer risk associated with germ line BRCA1 missense variants by functional analysis", *Cancer Res.* 67(4):1494-501, 2007.

Chai Y., Cui J., Shao N., et al., "The second BRCT domain of BRCA1 protein interacts with p53 and stimulates transcription from the p2WAF1/CIP1 promoter", *Oncogene* 18:263-269, 1999.

Chan J. K., Wong C. S., "Loss of E-cadherin is the fundamental defect in diffuse-type gastric carcinoma and infiltrating lobular carcinoma of the breast", *Adv. Anat. Pathol.* 8:165-172, 2001.

Chapman M. S., Verma I. M., "Transcriptional activation by BRCA1", *Nature* 382:678-679, 1996.

Chau V., Tobias J. W., Bachmair A. Et al., "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein", *Science* 243(4898):1576-1583, 1989.

- Cheadle J. P., Sampson J. R., "MUTYH-associated polyposis— from defect in base excision repair to clinical genetic testing", *DNA Repair (Amst)* 6: 274–279, 2007.
- Chen A., Kleiman F. E., Manley J. L., Ouchi T., Pan Z. Q., "Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase", *J. Biol. Chem.* 277(24):22085-22092, 2002.
- Chen C. F., Chen P. L., Zhong Q., Sharp Z. D., Lee W. H., "Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control", *J. Biol. Chem.* 274(46):32931-5, 1999.
- Chen J., "Ataxia-telangiectasia-related protein is involved in the phosphorylation of BRCA1 following deoxyribonucleic acid damage", *Cancer Res.* 60:5037-5039, 2000.
- Chen J. D., Lindblom P., Lindblom A., "A study of the PTEN/MMAC1 gene in 136 breast cancer families", *Hum. Genet.* 102:124-125, 1998.
- Chen J. J., Silver D. P., Walpita D. Et al., "Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells", *Mol. Cell.* 2:317-328, 1998.
- Chen P. L., Chen C. F., Chen Y. M. Et al., "The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5278-5292, 1998.
- Chen T., Carter D., Garrigue-Antar L., Reiss M., "Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer", *Cancer Res.* 58:4805-4810, 1998.
- Chen W. Y., Manson J. E., Hankinson S. E. Et al. "Unopposed estrogen therapy and the risk of invasive breast cancer", *Arch. Intern. Med.* 166:1027-1032, 2006.
- Chenevix-Trench G., Healey S., Lakhani S., et al., "Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance", *Cancer Res.* 66:2019-2027, 2006.
- Chiba N., Parvin J. D., "Redistribution of BRCA1 among four different protein complexes following replication blockage", *J. Biol. Chem.* 276:38549-38554, 2001.
- Chie W-C., Li C-Y., Huang C-S. Et al., "Oral contraceptives and breast cancer risk in Taiwan, a country of low incidence of breast cancer and low use of oral contraceptives", *Int. J. Cancer.* 77:219-223, 1998.
- Cho E., Spiegelman D., Hunter D. J. Et al., "Premenopausal fat intake and risk of breast cancer", *J. Natl. Cancer Inst.* 95:1079-1085, 2003.
- Cho J. H., Bang S., Park S. W., Chung J. B., Song S. Y., "BRCA2 mutations as a universal risk factor for pancreatic cancer has a limited role in Korean ethnic Group", *Pancreas* 36(4):337-40, 2008.
- Chompret A., Brugieres L., Ronsin M. Et al., "P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals", *Br. J. Cancer* 82:1932-1937, 2000.
- Christensen D. E., Brzovic P. S., Klevit R. E., "E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages", *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(10):941-948, 2007.

Chun H. J., Zheng L., Ahmad M. Et al., "Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency", *Nature* 419:395-399, 2002.

Ciccia A., Ling C., Coulthard R. et al., "Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM", *Mol. Cell.* 25(3):331-43, 2007.

Claes K., Machackova E, De Vos M. Et al., "Mutation analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes results in the identification of novel and recurrent mutations in 6/16 flemish families with breast and/or ovarian cancer but not in 12 sporadic patients with early-onset disease", *Hum. Mutat.* 13(3):256, 1999.

Claes K., Poppe B., Machackova E. Et al., "Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2", *Genes Chromosomes Cancer.* 37(3):314-20, 2003.

Claus E. B., Risch N., Thompson W. D., "Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study", *Am. J. Hum. Genet.* 48:232-242, 1991.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer., "Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease", *Lancet* 358(9291):1389-99, 2001.

Collaborative group on hormonal factors in breast cancer, "Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer", *Lancet* 350:1047-1059, 1997.

Cortez D., Wang Y., Qin J., Elledge S. J., "Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks", *Science* 286:1162-1166, 1999.

Couch F. J., Johnson M. R., Rabe K. G. Et al., "The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(2):342-6, 2007.

Cox D. G., Hankinson S. E., Hunter D. J., "No association between BRCA2 N372H and breast cancer risk", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(5):1353-4, 2005.

Crackower M. A., Scherer S. W., Rommens J. M. Et al., "Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development.", *Hum. Mol. Genet.* 5(5):571-9, 1996.

D

Davies A. A., Masson J-Y., McIlwraith M. J. Et al., "Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protien", *Mol. Cell.* 7:273-282, 2001.

Davies O. R., Pellegrini L., "Interaction with the BRCA2 C-terminus protects RAD51-DNA filaments form disassembly by BRC repeats", *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:475-483, 2007.

De Bock G. H., Schutte M., Krol-Warmerdan E. M. M. Et al., "Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2*1100delC variant", *J. Med. Genet.* 41:731-735, 2004.

- Debniak T., Scott R. J., Górski B. Et al., "Common variants of DNA repair genes and malignant melanoma", *Eur. J. Cancer* 44(1):110-4, 2008.
- Deffenbaugh A. M., Frank T. S., Hoffman M., Cannon-Albright L., Neuhausen S. L., "Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants", *Genet Test.* 6(2):119-21, 2002.
- De Jong M. M., Nolte I. M., Meerman G. J. T. Et al., "Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility", *J. Med. Genet.* 39:225-242, 2002.
- Del Giudice M. E., Fantus I. G., Ezzat S. et al., "Insulin and related factors in premenopausal breast cancer risk", *Breast Cancer Res. Treat.* 47:111-120, 1998.
- de La Hoya M., Díaz-Rubio E., Caldés T., "Denaturing gradient gel electrophoresis-based analysis of loss of heterozygosity distinguishes nonobvious, deleterious BRCA1 variants from nonpathogenic polymorphisms", *Clin. Chem.* 45(11):2028-30, 1999.
- de la Hoya M., Sulleiro S., Osorio A. Et al., "Clustering of cancer-related mutations in a subset of BRCA1 alleles: a study in the Spanish population", *Int. J. Cancer.* 100(5):618-9, 2002. (a)
- de la Hoya M., Osorio A., Godino J. Et al., "Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and cancer phenotype in Spanish breast/ovarian cancer families: implications for genetic testing", *Int. J. Cancer* 97(4):466-71, 2002. (b)
- De la Hoya M., Fernández J.M., Tosar A. Et al., "Association between BRCA1 mutations and ratio of female to male births in offspring of families with breast cancer, ovarian cancer, or both", *JAMA* 290(7):929-31, 2003.
- de la Hoya M., Gutiérrez-Enríquez S., Velasco E. Et al., "Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer", *Clin. Chem.* 52(8):1480-5, 2006.
- De Juan I., Esteban E., Palanca S., Barragán E., Bolufer P., "High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations", *Breast Cancer Res. Treat.* 2008 Jun 5. [Epub ahead of print]
- Derynck R., Akhurst R. J., Balmain A., "TGF-beta signalling in tumor suppression and cancer progression", *Nat. Genet.* 29:117-129, 2001.
- De Sanjosé S., Leóné M., Berez V. Et al., "Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study", *Int. J. Cancer.* 106(4):588-93, 2003.
- D'Souza I. Poorkaj P., Hong M. Et al., "Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(10):5598-603, 1999.
- Díez O., Osorio A., Durán M. et al., "Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects", *Hum. Mutat.* 22(4):301-12, 2003.
- Díez O., Gutiérrez-Enríquez S., Ramón y Cajal T. Et al., "Caution should be used when interpreting alterations affecting the exon 3 of the BRCA2 gene in breast/ovarian cancer families", *J. Clin. Oncol.* 25(31):5035-6, 2007. Author reply 5036-8.

Distelman-Menachem T., Shapira T., Laitman Y. Et al., "Analysis of BRCA1/BRCA2 genes' contribution to breast cancer susceptibility in high risk Jewish Ashkenazi women", *Fam. Cancer*. 2008 Sep 17. [Epub ahead of print]

Dong J., Chang-Claude J., Wu Y. Et al., "A high proportion of mutations in the BRCA1 gene in German breast/ovarian cancer families with clustering of mutations in the 3' third of the gene", *Hum. Genet.* 103(2):154-61, 1998.

Dong Y., Hakimi M. A., Chen X. et al., "Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair", *Mol. Cell.* 12(5):1087-99, 2003.

Donoho G., Brenneman M. A., Cui T. X. Et al., "Deletion of Brca2 exon 27 causes hypersensitivity to DNA crosslinks, chromosomal instability, and reduced life span in mice", *Genes Chromosomes Cancer* 36(4):317-31, 2003.

Dorgan J. F., Hunsberger S. A., McMahon R. P. et al., "Diet and sex hormones in girls: findings from a randomized controlled clinical trial", *J. Natl. Cancer Inst.* 95:132-141, 2003.

Dos Santos Silva I., Mangtani P., MacCormack V., et al., "Lifelong vegetarianism and risk of breast cancer: a population-based case-control study among south asian migrant women living in England", *Int. J. Cancer* 99:238-244, 2002.

Duncan T., Trewick S. C., Koivisto P. Et al., "Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16660-16665, 2002.

Dunning A. M., Chiano M., Smith N. R. Et al., "Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population", *Hum. Mol. Genet.* 6(2):285-9, 1997.

Dunning A. M., Ellis P. D., McBride S. et al., "A transforming growth factor beta I signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer", *Cancer Res.* 63:2610-2615, 2003.

Duran M., Esteban-Cardena E., Velasco E., Infante M., Miner C., "Mutational analysis of BRCA2 in Spanish breast cancer patients from Castilla-Leon: identification of four novel truncating mutations", *Hum. Mutat.* 21(4):448, 2003.

Durocher F., Shattuck-Eidens D., McClure M. Et al., "Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations", *Hum. Mol. Genet.* 5(6):835-42, 1996.

E

Eakin C. M., Maccoss M. J., Finney G. L., Klevit R. E., "Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(14):5794-5799, 2007.

Easton D. F., Ford D., Bishop D. T., "Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1 mutation carriers", Breast cancer linkage consortium, *Am. J. Hum. Genet.* 56:265-271, 1995.

Edwards S. M., Kote-Jarai Z., Meitz J. Et al., "Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene", *Am. J. Hum. Genet.* 72(1):1-12, 2003.

El-Harith el-H. A., Abdel-Hadi M. S., Steinmann D., Dork T., "BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Saudi Arabia", *Saudi Med. J.* 23(6):700-4, 2002.

Ellis D., Greenman J., Hodgson S. et al., "Low prevalence of germline BRCA1 mutations in early onset breast cancer without a family history", *J. Med. Genet.* 37(10):792-4, 2000.

Eng C., Brody L. C., Wagner T. M. Et al., Steering Committee of the Breast Cancer Information Core (BIC) Consortium, "Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1", *J. Med. Genet.* 38(12):824-33, 2001.

Esashi F., Christ N., Gannon J. Et al., "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair", *Nature* 434:598-604, 2005.

Esashi F., Galkin V. E., Yu X., Egelman E. H., West S. C., "Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2", *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:468-474, 2007.

Esteban Cardeñosa E., Bolufer Gilabert P., Palanca Suela S. et al., "Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families of Eastern Spain", *Breast Cancer Res. Treat.* 112(1):69-73; 2008.

F

Fabbro M., Savage K., Hobson K., et al., "BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage", *J. Biol. Chem.* 279(30):31251-8, 2004.

Fackenthal J. D., Cartegni L., Krainer A. R., Olopade O. I., "BRCA2 T2722R is a deleterious allele that causes exon skipping", *Am. J. Hum. Genet.* 71:625-631, 2002.

Fan S., Wang J., Yuan R. Et al., "BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells", *Science* 284:1354-1356, 1999.

Fan W, Jin S, Tong T, et al., "BRCA1 regulates GADD45 through its interactions with the OCT-1 and CAAT motifs", *J. Biol. Chem.* 277(10):8061-8070, 2002.

Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L. et al., "PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins", *Bioinformatics* 21(14):3176-8, 2005.

Figge M. A. And Blankenship L., "Missense mutations in the BRCT domain of BRCA-1 from high-risk women frequently perturb strongly hydrophobic amino acids conserved among mammals", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(6):1037-41, 2004.

Fitzgerald M. G., Bean J. M., Hegde S. R. Et al., "Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer", *Nat. Genet.* 15:307-310, 1997.

Fleming M. A., Potter J. D., Ramirez C. J., Ostrander G. K., Ostrander E. A., "Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: an evolutionary approach", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(3):1151-6, 2003.

- Folger S. G., Marchbanks P. A., McDonald J. A. Et al., "Risk of breast cancer associated with short-term use of oral contraceptives", *Cancer Causes Control* 18:189-198, 2007.
- Foray N., Marot D., Gabriel A., et al., "Subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein", *EMBO J.* 22(11):2860-71, 2003.
- Ford D., Easton D. F., Stratton M. Et al., "The Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families", *Am. J. Hum. Genet.* 62:676-689, 1998.
- Forman M. R., "Changes in dietary fat and fiber and serum hormone concentrations: nutritional strategies for breast cancer prevention over the life course", *J. Nutr.* 137(1 Suppl):170S-174S, 2007.
- Frank B., Hemminki K., Wappenschmidt B. Et al., "Association of the CASP10 V410I variant with reduced familial breast cancer risk and interaction with the CASP8 D302H variant", *Carcinogenesis* 27:606-609, 2006.
- Frank T. S., Deffenbaugh A. M., Reid J. E. et al., "Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: Analysis of 10,000 individuals", *J. Clin. Oncol.* 20:1480-1490, 2002
- Frebourg T., Barbier N., Yan Y. Et al., "Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome", *Am. J. Hum. Genet.* 56:608-615, 1995.
- Freedman L. S., Clifford C., Messina M., "Analysis of dietary fat, calories, body weight and the development of mammary tumors in rats and mice:a review", *Cancer Res.* 50:5710-5719, 1990.
- Freedman M. L., Penney K. L., Stram D. O. Et al., "Common variation in BRCA2 and breast cancer risk: a haplotype-based analysis in the Multiethnic Cohort", *Hum. Mol. Genet.* 13(20):2431-41, 2004.
- Fries M. H., Holt C., Carpenter I., "Diagnostic criteria for testing for BRCA1 and BRCA2: the experience of the Department of Defense Familial Breast/Ovarian Cancer Research Project", *Mil. Med.* 167(2):99-103, 2002.
- Frosk P., Burgess S., Dyck T., Jobse R., Spriggs E. L., "The use of ancestral haplotypes in the molecular diagnosis of familial breast cancer", *Genet Test.* 11(3):208-15, 2007.
- Frost P., Jugessur A., Apold J. Et al., "Complete mutation screening and haplotype characterization of the BRCA1 gene in 61 familial breast cancer patients from Norway", *Dis. Markers.* 21(1):29-36, 2005.
- Fuks F., Milner J., Kouzarides T., "BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF", *Oncogene* 17:2531-2534, 1998.
- Futreal P. A., Liu Q., Shattuck-Eidens D., "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas" *Science* 266(5182):120-2, 1994.

G

Gad S., Klinger M., Caux-Moncoutier V. Et al., “Bar code screening on combed DNA for large rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes in French breast cancer families”, *J. Med. Genet.* 39(11):817-21, 2002.

Galkin V. E., Esashi F., Yu X. Et al., “BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8537-8542, 2005.

Gallardo M., Silva A., Rubio L. et al., “Incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in 54 Chilean families with breast/ovarian cancer, genotype-phenotype correlations”, *Breast Cancer Res. Treat.* 95(1):81-7, 2006.

Ganesan S., Silver D. P., Greenberg R. A. Et al., “BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome”, *Cell* 111:393-405, 2002.

Gann P. H., Chatterton R. T., Gapstur S. M. Et al., “The effects of a low-fat/high-fiber diet on sex hormone levels and menstrual cycling in premenopausal women: a 12-month randomized trial (the diet and hormone study)”, *Cancer* 98:1870-1879, 2003.

Gao Q., Tomlinson G., Das S. et al., “Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among clinic-based African American families with breast cancer”, *Hum. Genet.* 107(2):186-91, 2000 Erratum in: *Hum Genet* 109(2):239-40, 2001.

Garber J. E., Goldstein A. M., Kantor A. F., Dreyfus M. G., Fraumeni Jr. J. F., Li F. P., “Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome”, *Cancer Res.* 51:6094-6097, 1991.

García-Closas M., Egan K. M., Newcomb P. A. Et al., “Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, and meta-analyses”, *Hum. Genet.* 119(4):376-88, 2006.

Garcia-Higuera I., Taniguchi T., Ganesan S. et al., “Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway”, *Mol. Cell.* 7(2):249-62, 2001.

Gayther S. A., Russell P., Harrington P. Et al., “The contribution of germline BRCA1 and BRCA2 mutations to familial ovarian cancer: no evidence for other ovarian cancer-susceptibility genes”, *Am. J. Hum. Genet.* 65(4):1021-9, 1999.

Gertig D. M., Fletcher A. S., English D. R., et al. “Hormone therapy and breast cancer: what factors modify the association?”, *Menopause* 13:178-184, 2006.

Giardello F. M., Welsh S. B., Hamilton S. R. Et al., “Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome”, *N. Eng. J. Med.* 316:1511-1514, 1987.

Giardello F. M., Brensinger J. D., Tersmette A. C. et al., “Very high risk risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome”, *Gastroenterology* 119:1447-1453, 2000.

Gill J. K., Press M. F., Patel A. V., Bernstein L. “Oral contraceptive use and risk of breast carcinoma in situ (United States)”, *Cancer Causes Control* 17:1155-1162, 2006.

Goldgar D. E., Easton D. F., Deffenbaugh A. M. Et al., Breast Cancer Information Core (BIC) Steering Committee, "Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2", *Am. J. Hum. Genet.* 75(4):535-44, 2004.

Gomendio B., Silva J. M., Garcia J. M. Et al., "Low incidence of germline BRCA2 gene mutations among Spanish breast cancer patients", *Oncology.* 57(2):173-4, 1999.

Goode E. L., Ulrich C. M., Potter J. D., "Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11(12):1513-30, 2002. Erratum in: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(10):1119, 2003.

Gough C. A., Gojobori T., Imanishi T., "Cancer-related mutations in BRCA1-BRCT cause long-range structural changes in protein-protein binding sites: a molecular dynamics study", *Proteins.* 66(1):69-86, 2007.

Goumenou A. G., Vassiliadis S., Matalliotakis I. M. Et al., "Mutation analysis of BrCA1, BrCA2, and p53 versus soluble HLA class I and class II in a case of familial endometriosis", *Fertil. Steril.* 79(2):445-8, 2003.

Graziano F., Humar B., Guilford P., "The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice", *Ann. Oncol.* 14:1705-1713, 2003.

Greenman J., Mohammed S., Ellis D. Et al., "Identification of missense and truncating mutations in the BRCA1 gene in sporadic and familial breast and ovarian cancer", *Genes Chromosomes Cancer.* 21(3):244-9, 1998.

Gudmundsdottir K, Lord CJ, Witt E, Tutt AN, Ashworth A., "DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells", *EMBO Rep.* 5(10):989-93, 2004.

Gutiérrez-Enríquez S., de la Hoya M., Martínez-Bouzas C. et al., "Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer", *Breast Cancer Res. Treat.* 103(1):103-7, 2007.

H

Hadjisavvas A., Adamou A., O'Dowd Phanis C. et al., "Q356R and S1512I are BRCA1 variants that may be associated with breast cancer in a Cypriot family", *Oncol. Rep.* 9(2):383-6, 2002.

Hadjisavvas A., Charalambous E., Adamou A, Christodoulou CG, Kyriacou K., "BRCA2 germline mutations in Cypriot patients with familial breast/ovarian cancer", *Hum. Mutat.* 21(2):171, 2003.

Haffty B. G., Silber A., Matloff E., Chung J., Lannin D., "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(2):133-7, 2006

Haiman C. A., Pike M. C., Bernstein L. Et al., "Ethnic differences in ovulatory function in nulliparous women", *Br. J. Cancer* 86:367-371, 2002.

Hall J. M., Lee M. K., Newman B. et al., "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21", *Science* 250(4988):1684-9, 1990.

- Hall J., "The Ataxia-telangiectasia mutated gene and breast cancer: gene expression profiles and sequence variants", *Cancer Lett.* 227:105-114, 2005.
- Hahn S. A., Greenhalf B., Ellis I. Et al., "BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma", *J. Natl. Cancer Inst.* 95(3):214-21, 2003.
- Han S. H., Lee K. R., Lee D. G. Et al., "Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 from 793 Korean patients with sporadic breast cancer", *Clin. Genet.* 70(6):496-501, 2006.
- Haraldsson K., Loman N., Zhang Q. X. Et al., "BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease", *Cancer Res.* 58(7):1367-71, 1998.
- Harkin D. P., Bean J. M., Miklos D. Et al., "Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1", *Cell* 97:575-586, 1999.
- Hartikainen J. M., Kataja V., Pirskanen M. Et al., "Screening for BRCA1 and BRCA2 mutations in Eastern Finnish breast/ovarian cancer families", *Clin. Genet.* 72(4):311-20, 2007.
- Hartman A. R., Ford J. M., "BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair", *Nat. Genet.* 32(1):180-4, 2002.
- Hashizume R., Fukuda M., Maeda I. et al., "The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation", *J. Biol. Chem.* 276(18):14537-14540, 2001.
- Healey C. S., Dunning A. M., Teare M. D. Et al., "A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability", *Nat. Genet.* 26(3):362-4, 2000.
- Hedau S., Jain N., Husain S. A. Et al., "Novel germline mutations in breast cancer susceptibility genes BRCA1, BRCA2 and p53 gene in breast cancer patients from India", *Breast Cancer Res. Treat.* 88(2):177-86, 2004.
- Hill T. D., Khamis H. J., Tyczynski J. E., Berkel H. J., "Comparison of male and female breast cancer incidence trends, tumor characteristics and survival", *Ann. Epidemiol.* 15:773-780, 2005.
- Hopper J. L., Southey M. C., Dite G. S. et al., "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.* 8:741-747, 1999.
- Horwitz A. A., Affar el B., Heine G. F., Shi Y., Parvin J. D., "A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(16):6614-6619, 2007.
- Howlett NG, Taniguchi T, Olson S. et al., "Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia", *Science* 297(5581):606-9, 2002.
- Hu Y. F., Li R., "JunB potentiates function of BRCA1 activation domain 1 (AD1) through a coiled-coil-mediated interaction", *Genes Dev.* 16(12):1509-17, 2002.

Hu N., Li W. J., Su H. Et al., “Common genetic variants of TP53 and BRCA2 in esophageal cancer patients and healthy individuals from low and high risk areas of northern China”, *Cancer Detect. Prev.* 27(2):132-8, 2003.

Hu N., Wang C., Han X. Y. Et al., “Evaluation of BRCA2 in the genetic susceptibility of familial esophageal cancer”, *Oncogene.* 23(3):852-8, 2004.

Hughes D. J., Ginolhac S. M., Coupier I. Et al., “Common BRCA2 variants and modification of breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers”, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(1):265-7, 2005

Hulka B.S., Moorman P.G., “Breast cancer: hormones and other risk factors”, *Maturitas* 38:103-113, 2001.

Humphrey J. S., Salim A., Erdos M. R. Et al., “Human BRCA1 inhibits growth in yeast: potential use in diagnostic testing”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(11):5820-5, 1997.

Hussain S. P. and Harris C. C., “Molecular epidemiology of human cancer:contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes”, *Cancer Res.* 58:4023-4037, 1998.

I

Infante M, Durán M, Esteban-Cardenosa E, Miner C, Velasco E., “High proportion of novel mutations of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer patients from Castilla-León (central Spain)”, *J. Hum. Genet.* 51(7):611-7, 2006.

Inoue R., Ushijima T., Fukutomi T. Et al., “BRCA2 germline mutations in Japanese breast cancer families”, *Int. J. Cancer.* 74(2):199-204, 1997.

J

Janda E., Lehman K., Killisch I. et al., “Ras and TGFbeta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways”, *J. Cell. Biol.* 156:299-313, 2002.

Jara L., Ampuero S., Santibáñez E. et al., “Molecular analysis of the eighteen most frequent mutations in the BRCA1 gene in 63 Chilean breast cancer families”, *Biol. Res.* 37(3):469-81, 2004.

Jara L, Ampuero S, Santibáñez E. et al., “BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American population”, *Cancer Genet. Cytogenet.* 166(1):36-45, 2006.

Jin Y., Xu X. L., Yang M. C. et al., “Cell cycle-dependent colocalization of BARD1 and BRCA1 proteins in discrete nuclear domains.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12075-12080, 1997.

Jiricny J., “The multifaceted mismatch-repair system”, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 335–346, 2006.

Joenje H., Patel K. J., “The emerging genetic and molecular basis of fanconi anaemia”, *Nature Rev.*

Genet. 2:446-459, 2001.

Johannsson O., Ostermeyer E. A., Håkansson S. et al., “Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden”, *Am. J. Hum. Genet.* 58(3):441-50, 1996.

Johannsson O. T., Idvall I., Anderson C. et al., “Tumour biological features of BRCA1-induced breast and ovarian cancer”, *Eur. J. Cancer* 33:362–371, 1997.

Johannsson O. T., Staff S., Vallon-Christersson J. et al., “Characterization of a novel breast carcinoma xenograft and cell line derived from a BRCA1 germ-line mutation carrier”, *Lab. Invest.* 83(3):387-96, 2003.

John E. M., Miron A., Gong G. et al., “Prevalence of pathogenic BRCA1 mutation carriers in 5 US racial/ethnic groups”, *JAMA* 298(24):2869-76, 2007.

Johnson N., Fletcher O., Naceur-Lombardelli C. et al., “Interaction between CHEK2*1100delC and other low-penetrance breast-cancer susceptibility genes: a familial study”, *Lancet* 366:1554-1557, 2005.

Johnson N., Fletcher O., Palles C. et al., “Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility”, *Hum. Mol. Genet.* 16(9):1051-7, 2007.

Jonsson B. A., Bergh A., Stattin P., Emmanuelsson M., Gronberg H., “Germline mutations in E-cadherin do not explain association of hereditary prostate cancer, gastric cancer and breast cancer”, *Int. J. Cancer* 98:838-843, 2002.

Judkins T., Hendrickson B. C., Deffenbaugh A. M. et al., “Application of embryonic lethal or other obvious phenotypes to characterize the clinical significance of genetic variants found in trans with known deleterious mutations”, *Cancer Res.* 65(21):10096-103, 2005. (a)

Judkins T, Hendrickson BC, Deffenbaugh AM, Scholl T. “Single nucleotide polymorphisms in clinical genetic testing: the characterization of the clinical significance of genetic variants and their application in clinical research for BRCA1”, *Mutat. Res.* 573(1-2):168-79, 2005. (b)

K

Kaaks R., “Nutrition, hormones, and breast cancer: is insulin the missing link?”, *Cancer Causes Control* 7:605-625, 1996.

Kanaan Y., Kpenu E., Utley K. Et al., “Inherited BRCA2 mutations in African Americans with breast and/or ovarian cancer: a study of familial and early onset cases”, *Hum. Genet.* 113(5):452-60, 2003.

Karchin R., Monteiro A. N., Tavtigian S. V. et al., “Functional impact of missense variants in BRCA1 predicted by supervised learning”, *PLoS Comput. Biol.* 3:e26, 2007.

Karchin R., Agarwal M., Sali A. Et al., “Classifying Variants of Undetermined Significance in BRCA2 with Protein Likelihood Ratios”, *Cancer Informatics* 6:203–216, 2008.

- Kawahara M., Sakayori M., Shiraishi K. Et al., "Identification and evaluation of 55 genetic variations in the BRCA1 and the BRCA2 genes of patients from 50 Japanese breast cancer families", *J. Hum. Genet.* 49(7):391-5, 2004.
- Kawai H., Li H., Chun P., Avraham S., Avraham H. K., "Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells", *Oncogene* 21(50):7730-9, 2002.
- Keller G., Vogelsang H., Becker I. Et al., "Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation", *Am. J. Pathol.* 155:337-342, 1999.
- Kelsey J. L., Gammon M. D., John E. M., "Reproductive factors and breast cancer", *Epidemiol. Rev.* 15:36-47, 1993.
- Kelsey J. L., and Bernstein L., "Epidemiology and prevention of breast cancer", *Annu. Rev. Public Health* 17:47-67, 1996.
- Key T. J., Allen N. E., Spencer E. A., Travis R. C., "Nutrition and breast cancer", *Breast* 12:412-416, 2003.
- Khandwala H. M., McCutcheon I. E., Flyvbjerg A., Friend K. E., "The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth", *Endocr. Rev.* 21:215-244, 2000.
- Khittoo G., Manning A., Mustun H. Et al., "Mutation analysis of a Mauritian hereditary breast cancer family reveals the BRCA2 6503deITT mutation previously found to recur in different ethnic populations", *Hum Hered.* 52(1):55-8, 2001.
- Kilpivaara O., Vahteristo P., Falck J. Et al., "CHEK2 variant 1157T may be associated with increased cancer risk", *Int. J. Cancer* 111:543-547, 2004.
- Kim B. Y., Lee D. G., Lee K. R. Et al., "Identification of BRCA1 and BRCA2 mutations from Korean breast cancer patients using denaturing HPLC", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349(2):604-10, 2006.
- King M. C., Marks J. H., Mandell J. B., "Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2", *Science* 302:643-646, 2003.
- Kleiman F. E., Wu-Baer F., Fonseca D. Et al., "BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II", *Genes Dev.* 19(10):1227-1237, 2005.
- Konstantopoulou I., Kroupis C., Ladopoulou A. Et al., "BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece", *Hum. Mutat.* 16(3):272-3, 2000.
- Konstantopoulou I., Rampias T., Ladopoulou A. Et al., "Greek BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum: two BRCA1 mutations account for half the carriers found among high-risk breast/ovarian cancer patients", *Breast Cancer Res. Treat.* 107(3):431-41, 2008.
- Koul A., Nilbert M., Borg A., "A somatic BRCA2 mutation in RER+ endometrial carcinomas that specifically deletes the amino-terminal transactivation domain", *Genes. Chrom. Cancer* 24:207-212, 1999.

Kumle M., Weiderpass E., Braaten T. Et al., "Use of oral contraceptives and breast cancer risk: the Norwegian-Swedish women's lifestyle and health cohort study", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11:1375-1381, 2002.

Kuznetsov S. G., Liu P., Sharan S. K., "Mouse embryonic stem cell-based functional assay to evaluate mutations in BRCA2", *Nat. Med.* 14(8):875-81, 2008.

L

Lahmann P. H., Hoffmann K., Allen N. et al., "Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC)", *Int. J. Cancer* 111:762-771, 2004.

Lakhani S. R., Jacquemier J., Sloane J. P. et al., "Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations", *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 1138-1145, 1998.

Laloo F., Varley J., Moran A. et al., "BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives", *Eur. J. Cancer.* 42(8):1143-50, 2006.

LaVecchia C., Negri E., Franceschi S. Et al., "Oral contraceptives and breast cancer: a cooperative Italian study", *Int. J. Cancer.* 60:163-167, 1995.

Le Page F., Randrianarison V., Marot D. Et al., "BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells", *Cancer Res.* 60, 5548-5552, 2000.

Lee J. S., Collins K. M., Brown A. L., Lee C. H., Chung J. H., "hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response", *Nature* 404:201-204, 2000.

Lehman K., Janda E., Pierreux C. E. Et al., "Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells", *Genes Dev.* 14:2610-2622, 2000.

Leibeling D., Laspe P., Emmert S., "Nucleotide excision repair and cancer", *J. Mol. Histol.* 37: 225-238, 2006.

Le Page F., Randrianarison V., Marot D. Et al., "BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells", *Cancer Res.* 60:5548-5552, 2000.

Li H., Lee T-H., Avraham H., "A Novel Tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc Inhibits c-Myc-induced Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene (hTERT) Promoter Activity in Breast Cancer", *J. Biol. Chem.* 277(23):20965-20973, 2002.

Li J, Zou C, Bai Y, Wazer DE, Band V, Gao Q., "DSS1 is required for the stability of BRCA2", *Oncogene* 25(8):1186-94, 2006.

- Li S., Chen P. L., Subramanian T., et al., "Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage.", *J. Biol. Chem.* 274:11334-11338, 1999.
- Li X. And Heyer W-D, "Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance", *Cell Res.* 18:99-113, 2008.
- Liaw D., Marsh D. J., Li J. Et al., "Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome", *Nat. Genet.* 16:64-67, 1997.
- Liede A., Malik I. A., Aziz Z. Et al., "Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to breast and ovarian cancer in Pakistan", *Am. J. Hum. Genet.* 71(3):595-606, 2002.
- Llewellyn D. H., Scobie G. A., Urquhart A. J. Et al., "Acute intermittent porphyria caused by defective splicing of porphobilinogen deaminase RNA: a synonymous codon mutation at -22 bp from the 5' splice site causes skipping of exon 3", *J Med Genet.* 33(5):437-8, 1996.
- Llort G., Muñoz C. Y., Tuser M. P. Et al., "Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain", *Hum Mutat.* 19(3):307, 2002.
- Lim W., Hearle N., Shah B. Et al., "Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome", *Br. J. Cancer* 89:308-313, 2003.
- Lin H-R., Ting N.S.Y., Qin J., Lee W-H., "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(38):35979-35987, 2003.
- Ling C., Ishiai M., Ali A. M. Et al., "FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway", *EMBO J.* 26(8):2104-14. Epub 2007 Mar 29, 2007.
- Lipworth L., Bailey L. R., Trichopoulos D., "History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature", *J. Natl. Cancer. Inst.* 92:302-312, 2000.
- Lipworth L., Katsouyanni K., Stuver S., et al., "Oral contraceptives, menopausal estrogens, and the risk of breast cancer: a case-control study in Greece", *Int. J. Cancer.* 62:548-551, 1995.
- Liu H. X., Cartegni L., Zhang M. Q., Krainer A. R., "A mechanism for exon-skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes", *Nat. Genet.* 27:55-58, 2001.
- Lord C. J. And Ashworth A., "RAD51, BRA2 and DNA repair: a partial resolution", *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(6):461-462, 2007.
- Lorick K. L., Jensen J. P., Fang S., Ong A. M., Hatakeyama S., Weissman A. M. "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(20):11364-9, 1999.
- Lovelock P. K., Healey S., Au W. Et al., "Genetic, functional, and histopathological evaluation of two C-terminal BRCA1 missense variants", *J. Med. Genet.* 43:74-83, 2006.
- Lovelock P. K., Spurdle A. B., Mok M. T., "Identification of BRCA1 missense substitutions that confer partial functional activity: potential moderate risk variants?", *Breast Cancer Res.* 9(6):R82, 2007.

Lubinski J., Phelan C. M., Ghadirian P. Et al., "Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene", *Fam. Cancer*. 3(1):1-10, 2004.

Lucke C. D., Philpott A., Metcalfe J. C. et al., "Inhibiting mutations in the transforming growth factor beta type 2 receptor in recurrent human breast cancer", *Cancer Res*. 61:482-485, 2001.

M

MacLachlan T. K., Somasundaram K., Sgagias M. Et al., "BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets", *Mol. Cell Biol*. 22:4280-4292, 2002.

MacPherson G., Healey C. S., Teare M. D. Et al., "Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer", *J. Natl. Cancer Inst*. 96:1866-1869, 2004.

Mailand N., Bekker-Jensen S., Fastrup H. Et al., "RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins", *Cell* 131(5):887-900, 2007.

Malandar S., Ridderheim M., Måsbäck A. et al., "One in 10 ovarian cancer patients carry germ line BRCA1 or BRCA2 mutations: results of a prospective study in Southern Sweden", *Eur. J. Cancer*. 40(3):422-8, 2004.

Malkin D., Li F., Strong L. et al., "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms", *Science* 250:1233-1238, 11990.

Mallery D. L., Vandenberg C. J., Hiom K., "Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains", *Embo J*. 21(24):6755-6762, 2002.

Mallory S. B., "Cowden Syndrome (multiple hamartoma syndrome)", *Dermatol. Clin*. 13:27-31, 1995.

Malone K. E., Daling J. R., Neal C. et al., "Frequency of BRCA1/BRCA2 mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases", *Cancer* 88(6):1393-402, 2000.

Manguoglu A. E., Lüleci G., Ozçelik T. Et al., "Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients", *Hum. Mutat*. 21(4):444-5, 2003.

Manke I. A., Lowery D. M., Nguyen A., Yaffe M. B., "BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting", *Science* 302(5645):636-639, 2003.

Marchbanks P. A., McDonald J. A., Wilson H. G. Et al., "Oral contraceptives and the risk of breast cancer", *N. Engl. J. Med*. 346:2025-2032, 2002.

Marcus J. N., Watson P., Page D. L. et al., "BRCA2 hereditary breast cancer pathophenotype", *Breast Cancer Res. Treat*. 44: 275-277, 1997.

Marmorstein L. Y., Ouchi T., Aaronson S. A., "The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13869-13874, 1998.

Marroni F., Aretini P., D'Andrea E. Et al., "Penetrance of breast and ovarian cancer in a large series of families tested for BRCA1/2 mutations", *Eur. J. Hum. Genet*. 12:899-906, 2004.

Marston N. J., Richards W. J., Hughes D., et al., "Interaction between the product of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 and DSS1, a protein functionally conserved from yeast to mammals", *Mol. Cell Biol.* 19(7):4633-42, 1999.

Martin L.J., Boyd N.F., "Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence.", *Breast Cancer Res.* 10(1):201, 2008.

Martínez-Ferrandis J. I., Vega A., Chirivella I. Et al., "Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in Mediterranean Spanish women with early-onset breast cancer: identification of three novel pathogenic mutations", *Hum. Mutat.* 22(5):417-8, 2003.

Mastracci T. L., Tjan S., Bane A. L., O'Malley F. P., Andrulis I. L., "E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast", *Mod. Pathol.* 18:741-751, 2005.

Martin S. T., Matsubayashi H., Rogers C. D. Et al., "Increased prevalence of the BRCA2 polymorphic stop codon K3326X among individuals with familial pancreatic cancer", *Oncogene* 24(22):3652-6, 2005.

Mazoyer S., "Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes", *Hum. Mutat.* 25(5):415-22, 2005.

McKean-Cowdin R., Spencer Feigelson H., Xia L. Y. Et al., "BRCA1 variants in a family study of African-American and Latina women", *Hum. Genet.* 116(6):497-506, 2005.

McPherson K., Neil A., Vessey M. P., Doll R., "Oral contraceptives and breast cancer", *Lancet* 2:1414-1415, 1983.

McPherson K., Steel C. M., Dixon J. M., "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics", *BMJ* 321:624-628, 2000.

Meetei A. R., de Winter J. P., Medhurst A. L. et al., "A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia", *Nat. Genet.* 35(2):165-70, 2003.

Meijers-Heijboer H., Van den Ouweland A., Klijn J. Et al., "Low penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations", *Nat. Genet.* 31:55-59, 2002.

Meijers-Heijboer H., Wijnen J., Vasen H. Et al., "The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast cancer and colorectal cancer phenotype", *Am. J. Hum. Genet.* 72:1308-1314, 2003.

Meindl A.; German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer, "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(4):472-80, 2002.

Menzel H. J., Sarmanova J., Soucek P. Et al., "Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations", *Br. J. Cancer.* 90(10):1989-94, 2004.

- Meyer P., Voigtlaender T., Bartram C. R., Klaes R., “Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany”, *Hum. Mutat.* 22(3):259, 2003.
- Michels K. B., Mohllajee A. P., Roset-Bahmanyar E., Beehler G. P., Moysich K. B., “Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies”, *Cancer* 109, 2007.
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., et al., “A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1”, *Science* 266(5182):66-71, 1994.
- Milne R. L., Osorio A., Ramón y Cajal T. Et al., “The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for Carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain”, *Clin. Cancer Res.* 14(9):2861-9, 2008.
- Milner J., Ponder B., Hughes-Davies L., Seltmann M., Kouzarides T., “Transcriptional activation functions in BRCA2”, *Nature* 386:772-773, 1997.
- Milner J., Fuks F., Hughes-Davies L., Kouzarides T., “The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase”, *Oncogene* 19:4441-4445, 2000.
- Miramar M. D., Calvo M. T., Rodriguez A. Et al., “Genetic analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer families from Aragon (Spain): two novel truncating mutations and a large genomic deletion in BRCA1”, *Breast Cancer Res. Treat.* 112(2):353-8, 2008
- Mirkovic N., Marti-Renom M. A., Weber B. L., Sali A., Monteiro A. N., “Structure-based assessment of missense mutations in human BRCA1: implications for breast and ovarian cancer predisposition”, *Cancer Res.* 64(11):3790-7, 2004.
- Mizuta R., LaSalle J. M., Cheng H. L. et al., “Rab22 and Rab163/Mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6927-6932, 1997.
- Montagna M., Dalla Palma M., Menin C. et al., “Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families”, *Hum. Mol. Genet.* 12(9):1055-61, 2003.
- Monteiro A. N., August A., Hanafusa H., “Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13595-13599, 1996.
- Morris J. R., Solomon E. ,“BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair”, *Hum. Mol. Genet.* 13(8):807-17, 2004.
- Moynahan M. E., Cui T. Y., Jasin M., “Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation”, *Cancer Res.* 61(12):4842-50, 2001.
- Moynahan M. E., Pierce A. J., Jasin M., “BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks”, *Mol. Cell.* 7:263-272, 2001.
- Moynahan M. E., Chiu J. W., Koller B. H., Jasin M.,“Brca1 controls homology-directed DNA repair”,*Mol. Cell.* 4(4):511-8, 1999.

Mukhopadhyay D., Riezman H., "Proteasome-independent functions of ubiquitina in endocytosis and signalling", *Science* 315(5809):201-205, 2007.

Mullan P. B., Quinn J., Gilmore P. M., et al., "BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents.", *Oncogene* 20: 6123-6131, 2001.

Musolino A., Bella M. A., Bortesi B. Et al., "BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study", *Breast* 16(3):280-92, 2007.

N

Nakken S, Alseth I, Rognes T., "Computational prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes", *Neuroscience*. 145(4):1273-9, 2007.

Nanda R., Schumm L. P., Cummings S., et al., "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* 294:1925-1933, 2005.

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

Nelen M. R., Padberg G. W., Peeters E. A. J. Et al., "Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23", *Nat. Genet.* 13:114-116, 1996.

Neuhausen S. L., Godwin A. K., Gershoni-Baruch R. Et al., "Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study", *Am. J. Hum. Genet.* 62(6):1381-8, 1998.

Ng P. C., Henikoff S., "Predicting deleterious amino acid substitutions", *Genome Res.* 11(5):863-74, 2001.

Niedzwiedz W., Mosedale G., Johnson M. et al., "The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair". *Mol. Cell.* 15(4):607-20, 2004.

Nielsen K. B., Sørensen S., Cartegni L. et al., "Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer", *Am. J. Hum. Genet.* 80(3):416-32, 2007. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 80(4):816, 2007.

Nishikawa H., Ooka S., Sato K. Et al., "Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase", *J. Biol. Chem.* 279(6):3916-3924, 2004.

Nordling M., Karlsson P., Wahlström J. Et al., "A large deletion disrupts the exon 3 transcription activation domain of the BRCA2 gene in a breast/ovarian cancer family", *Cancer Res.* 58:1372-1375, 1998.

O

Ohta T., Fukuda M., "Ubiquitin and breast cancer", *Oncogene* 23(11):2079-2088, 2004.

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

Olsson H., Moller T. R., Ranstam J., "Early oral contraceptive use and breast cancer among premenopausal women: final report from a study in southern Sweden", *J. Natl. Cancer. Inst.* 81:1000-1004, 1989.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T., "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770, 1989.

Osorio A., Robledo M., San Román J. M. Et al., "Mutation analysis of the BRCA2 gene in breast/ovarian cancer Spanish families: identification of two new mutations", *Cancer Lett.* 121(2):115-8, 1997.

Osorio A., Barroso A., Martínez B. Et al., "Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families", *Br. J. Cancer.* 82(7):1266-70, 2000.

Osorio A., de la Hoya M., Rodríguez-López R. Et al., "Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer", *Int. J. Cancer.* 99(2):305-9, 2002.

Osorio A., de la Hoya M., Rodríguez-López R. Et al., "Over-representation of two specific haplotypes among chromosomes harbouring BRCA1 mutations", *Eur. J. Hum. Genet.* 11(6):489-92, 2003.

Ouchi T., Monteiro A. N., August A., Aaronson S. A., Hanafusa H., "BRCA1 regulates p53-dependent gene expression", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2302-2306, 1998.

Ozcelik H., Knight J. A., Glendon G. Et al., "Individual and family characteristics associated with protein truncating BRCA1 and BRCA2 mutations in an Ontario population based series from the Cooperative Family Registry for Breast Cancer Studies", *J. Med. Genet.* 40(8):e91, 2003.

P

Pal T., Permeth-Wey J., Betts J. A. Et al., "BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases", *Cancer* 104(12):2807-16, 2005.

Palanca Suela S., Esteban Cardeñosa E., Barragán González E. Et al., "Identification of a novel BRCA1 large genomic rearrangement in a Spanish breast/ovarian cancer family", *Breast Cancer Res. Treat.* 112(1):63-67, 2008.

Panguluri R. C., Brody L. C., Modali R. Et al., "BRCA1 mutations in African Americans", *Hum. Genet.* 105(1-2):28-31, 1999.

Parkin D. M., "International variation", *Oncogene* 23:6329-6340, 2004.

- Parkin D. M., Pisani P., Ferlay J., "Global cancer statistics", *CA Cancer J. Clin.* 49:33-64,1, 1999.
- Patel K. J., Yu V.P.C.C., Lee H. Et al., "Involvement of BRCA2 in DNA repair", *Mol. Cell.* 1:347-357, 1998.
- Pathak D. R., Osuch J. R., He J., "Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations", *Cancer* 88:1230-1238, 2000.
- Paull T. T., Cortez D., Bowers B., Elledge S. J., Gellert M., "Direct DNA binding by BRCA1", *PNAS* 98(11):6086-6091, 2001.
- Peixoto A., Salgueiro N., Santos C. et al., "BRCA1 and BRCA2 germline mutational spectrum and evidence for genetic anticipation in Portuguese breast/ovarian cancer families", *Fam. Cancer.* 5(4):379-87, 2006.
- Peng M., Litman R., Xie J. et al., "The FANCI/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells", *EMBO J.* 26(13):3238-49, 2007.
- Petersen G. M., Parmigiani G., Thomas D., "Missense mutations in disease genes: a Bayesian approach to evaluate causality", *Am. J. Hum. Genet.* 62(6):1516-24, 1998.
- Petrij-Bosch A., Peelen T., van Vliet M. Et al., "BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients", *Nat. Genet.* 17(3):341-5, 1997 Erratum in: *Nat Genet* 17(4):503, 1997
- Pichierri P., Rosselli F., "The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways", *EMBO J.* 23:1178-1187, 2004.
- Pharoah P. D., Guilford P., Caldas C., "Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 mutation Carriers from hereditary diffuse gastric cancer families", *Gastroenterology* 121:1348-1353, 2001.
- Pharoah P. D., Antoniou A., Bobrow M. Et al., "Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention", *Nat. Genet.* 31:33-36, 2002.
- Phelan CM, Kwan E, Jack E. Et al., "A low frequency of non-founder BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish breast-ovarian cancer families", *Hum. Mutat.* 20(5):352-7, 2002.
- Phelan C. M., Dapic V., Tice B. Et al., "Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance", *J. Med. Genet.* 42(2):138-46, 2005.
- Pickart C. M., "Back to the future with ubiquitin", *Cell* 116(2):181-190, 2004.
- Pike M.C., Spicer D.V., Dahmouch L., Press M. F., "Estrogens, progestogens, normal breast proliferation, and breast cancer risk", *Epidemiol. Rev.* 15:17-35, 1993.
- Pinheiro S. P., Holmes M. D., Pollak M. N., Barbieri R. L., Hankinson S. E., "Racial differences in premenopausal endogenous hormones", *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 14:2147-2153, 2005.

Pippard E. C., Hall A. J., Barker D. J., Bridges B. A., "Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia-telangiectasia and xeroderma pigmentosum in Britain", *Cancer Res.* 48:2929-2932, 1988.

Plon S. E., Eccles D. M., Easton D. Et al., "Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results", *Hum. Mutat.* 29(11):1282-1291, 2008.

Pluquet O., Hainaut P., "Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction", *Cancer Lett.* 174:1-15, 2001.

Pohlreich P., Stribrná J., Kleibl Z. Et al., "Mutations of the BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic", *Med. Princ. Pract.* 12(1):23-9, 2003.

Poole A. J., Li Y., Kim Y. Et al., "Prevention of BRCA1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist", *Science* 314(5804):1467-1470, 2006.

Pollán M., Ramis R., Aragonés N. Et al., "Municipal distribution of breast cancer mortality among women in Spain", *BMC Cancer*: 7(78), 2007.

Prentice R. L., Caan B., Chlebowski R. T. Et al., "Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer", *JAMA* 295:629-642, 2006.

Preobrazhenska O., Yakymovych M., Kanamoto T. Et al., "BRCA2 and Smad3 synergize in regulation of gene transcription", *Oncogene* 21:5660-5664, 2002.

Puget N., Gad S., Perrin-Vidoz L. et al., "Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot", *Am. J. Hum. Genet.* 70:858-865, 2002.

Pyne M. T., Pruss D., Ward B. E., Scholl T., "A characterization of genetic variants in BRCA1 intron 8 identifies a mutation and a polymorphism", *Mutat. Res.* 406(2-4):101-7, 1999.

R

Rajasekaran R, Doss GP, Sudandiradoss C. et al., "Computational and structural investigation of deleterious functional SNPs in breast cancer BRCA2 gene", *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24(5):851-6, 2008.

Rajasekaran R, Sudandiradoss C, Doss CG, Sethumadhavan R., "Identification and in silico analysis of functional SNPs of the BRCA1 gene", *Genomics* 90(4):447-52, 2007.

Ramus S. J., Vierkant R. A., Johnatty S. E. Et al., "Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer", *Int. J. Cancer.* 123(2):380-8, 2008.

Rebbeck T. R., "Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective", *Cancer* 86:2493-2501, 1999.

Renwick A., Thompson D., Seal S. et al., "ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles", *Nat. Genet.* 38:873-875, 2006.

Romieu I., Berlin J. A., Colditz G., "Oral contraceptives and breast cancer. Review and meta-analysis", *Cancer* 66:2253-2263, 1990.

Rose D. P., Komminou D., Stephenson G.D., "Obesity, adipocytokines and insuline resistance in breast cancer", *Obesity Rev.* 5:153-165, 2004.

Rosfjord E. C., Dickson R. B., "Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells", *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia* 4:229-237, 1999.

Rossouw J. E., Anderson G. L., Prentice R. L. Et al., "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial", *JAMA* 288:321-333, 2002.

S

Sachdev D., Hartell J. S., Lee A. V., Zhang X., Yee D., "A dominant negative type I insulin-like growth factor receptor inhibits metastasis of human cancer cells", *J. Biol. Chem.* 279:5017-5024, 2004.

Salahsor S., Lei H. X., Huo H. G. Et al., "Low frequency of E-cadherin alterations in familial breast cancer", *Breast Cancer Res.* 3:199-207, 2001.

Salazar R., Cruz-Hernandez J. J., Sanchez-Valdivieso E. Et al., "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(1):172-7, 2006.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

Santarosa M, Viel A, Boiocchi M., "Splice variant lacking the transactivation domain of the BRCA2 gene and mutations in the splice acceptor site of intron 2", *Genes Chromosomes Cancer.* 26(4):381-2, 1999. (a)

Santarosa M, Dolcetti R, Magri MD. Et al., "BRCA1 and BRCA2 genes: role in hereditary breast and ovarian cancer in Italy", *Int. J. Cancer.* 83(1):5-9, 1999. (b)

Sato K., Hayami R., Wu W. Et al., "Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase", *J. Biol. Chem.* 279(30):30919-30922, 2004.

Saxena S., Chakraborty A., Kaushal M. Et al., "Contribution of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations to breast cancer in Northern India", *BMC Med. Genet.* 7:75, 2006.

Schell T., Kulozik A. E., Hentze M. W., "Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway", *Genome Biol.* 3(3):REVIEWS1006, 2002.

Schoumacher F., Glaus A., Mueller H. Et al., "BRCA1/2 mutations in Swiss patients with familial or early-onset breast and ovarian cancer", *Swiss Med. Wkly.* 131(15-16):223-6, 2001.

- Schouten J. P., McElgunn C. J., Waaijer R. Et al., "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification", *Nucleic Acids Res.* 30(12):e57, 2002.
- Schubert E. L. et al. "BRCA2 in american families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2", *Am. J. Hum. Genet.* 60:1031-1040, 1997.
- Schweitzer S., Hogge J. P., Grimes M., Bear H. D., de Paredes E. S., "Cowden disease: a cutaneous marker for increased risk of breast cancer", *AJR Am. J. Roentgenol.* 172:349-351, 1999.
- Scott R. J., Vajdic C. M., Armstrong B. K. Et al., "BRCA2 mutations in a population-based series of patients with ocular melanoma", *Int. J. Cancer* 102(2):188-91, 2002. Erratum in: *Int J Cancer* 105(6):882, 2003.
- Scully R., Anderson S. F., Chao D. M. Et al., "BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5605-5610, 1997.
- Scully R, Ganesan S, Vlasakova K. et al., "Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line", *Mol Cell.* 4(6):1093-9, 1999.
- Scully R, Chen J, Ochs RL. Et al., "Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage", *Cell.* 90(3):425-35, 1997.
- Sellers T. A., Vierkant R. A., Cerhan J. R. Et al., "Interaction of folate intake, alcohol and risk of hormone receptor-defined breast cancer in a prospective study of postmenopausal women", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11:1104-1107, 2002.
- Sensi E., Tancredi M., Aretini P. Et al., "p53 inactivation is a rare event in familial breast tumors negative for BRCA1 and BRCA2 mutations", *Breast Cancer Res. Treat.* 82(1):1-9, 2003.
- Seo J. H., Cho D. Y., Ahn S. H. Et al., "BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Korean patients with sporadic breast cancer", *Hum. Mutat.* 24(4):350, 2004.
- Serova-Sinilnikova O. M., Boutrand L., Stoppa-Lyonnet D. Et al., "BRCA2 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in France", *Am. J. Hum. Genet.* 60(5):1236-9, 1997.
- Sharan S. K., Morimatsu M., Albrecht U. Et al., "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by RAD51 in mice Lacking BRCA2", *Nature* 386:804-810, 1997.
- Sharan S. K., Pyle A., Coppola V. Et al., "BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility", *Development* 131:131-142, 2004.
- Shattuck-Eidens D., McClure M., Simard J. et al., "A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. Implications for presymptomatic testing and screening", *JAMA* 273(7):535-41, 1995.
- Shen S. X., Weaver Z., Xu X. Et al., "A targeted disruption of the murine *Brcal* gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability.", *Oncogene* 17(24):3115-3124, 1998.
- Sherr C. J., Roberts J. M., "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression", *Genes Dev.* 13:1501-1512, 1999.

Shih H. A., Nathanson K. L., Seal S. et al., "BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers", *Clin. Cancer Res.* 6(11):4259-64, 2000.

Shin S., Verma I. M., "BRCA2 cooperates with histone acetyltransferases in androgen receptor-mediated transcription", *PNAS* 100(12):7201-7206, 2003.

Shrivastav M., De Haro L. P., Nickoloff J. A., "Regulation of DNA double-strand break repair pathway Choice", *Cell Res.* 18:134-147, 2008.

Siddique H., Zou J-P., Rao V.R., Reddy E.S.P., "The BRCA2 is a histone acetyltransferase", *Oncogene* 16:2283-2285, 1998.

Sigurdson A. J., Hauptmann M., Chatterjee N. et al., "Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes", *BMC Cancer.* 4:9, 2004.

Simard J., Dumont M., Moisan A. M. Et al., "Evaluation of BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer", *J. Med. Genet.* 44(2):107-21, 2007 Erratum in: *J Med Genet.* 44(7):471, 2007.

Sinclair C. S., Berry R., Schaid D., Thibodeau S. N., Couch F. J., "BRCA1 and BRCA2 have a limited role in familial prostate cancer", *Cancer Res.* 60(5):1371-5, 2000.

Sinclair C. S., Adem C., Naderi A. et al., "TBX2 is preferentially amplified in BRCA1- and BRCA2-related breast tumors", *Cancer Res.* 62(13):3587-91, 2002.

Singletary K. W., and Gapstur S. M., "Alcohol and breast cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms", *JAMA* 286:2143-2151, 2001.

Sivaraman L., Medina D., "Hormone-induced protection against breast cancer", *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 7:77-92, 2002.

Smith PJ, Zhang C, Wang J. Et al., "An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers", *Hum. Mol. Genet.* 115(16):2490-508, 2006.

Smith-Warner S. A., Spiegelman D., Yaun S. S. et al., "Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies", *JAMA* 279:535-540, 1998.

Smogorzewska A., Matsuoka S., Vinciguerra P. et al., "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair", *Cell* 129(2):289-301, 2007.

Sng J. H., Ali A. B., Lee S. C. Et al., "BRCA1 c.2845insA is a recurring mutation with a founder effect in Singapore Malay women with early onset breast/ovarian cancer", *J. Med. Genet.* 40(10):e117, 2003.

Sobhian B., Shao G., Lilli D. R. Et al., "RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites", *Science* 316(5828):1198-1202, 2007.

Somasundaram K., Zhang H., Zeng X. Y. Et al., "Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF/ciP1", *Nature* 389:187-190, 1997.

- Song C. G., Hu Z., Wu J. Et al., "The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in eastern Chinese women with breast cancer", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132(10):617-26, 2006
- Spain B. H., Larson C. J., Shihabuddin L. S., Gage F. H., Verma I. M., "Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(24):13920-5, 1999.
- Spearman A. D., Sweet K., Zhou X. P. et al., "Clinically Applicable Models to Characterize BRCA1 and BRCA2 Variants of Uncertain Significance", *J. Clin. Oncol.* 2008
- Spiegelman A. D., Murday V., Phillips R. K., "Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome", *Gut* 30:1588-1590, 1989.
- Spitzer E., Abbaszadegan M. R., Schmidt F. Et al., "Detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families by a comprehensive two-stage screening procedure", *Int. J. Cancer.* 85(4):474-81, 2000.
- Spurdle A. B., Hopper J. L., Chen X. Et al., "The BRCA2 372 HH genotype is associated with risk of breast cancer in Australian women under age 60 years", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11(4):413-6, 2002.
- Starita L. M., Machida Y., Sankaran S. et al., "BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number", *Mol. Cell Biol.* 24(19):8457-8466, 2004.
- Starita L. M., Horwitz A. A., Keogh M. C. et al., "BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II", *J. Biol. Chem.* 280(26):24498-24505, 2005.
- Stark J. M., Pierce A. J., Oh J., Pastink A., Jasin M., "Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences", *Mol. Cell. Biol.* 24(21):9305-16, 2004.
- Stitzel N. O., Tseng Y. Y., Pervouchine D. Et al., "Structural location of disease-associated single-nucleotide polymorphisms", *J. Mol. Biol.* 327:1021-1030, 2003.
- Stratton M. R. And Rahman N., "The emerging landscape of breast cancer susceptibility", *Nat. Genet.* 40(1):17-22, 2008.
- Strong L. C., Williams W. R., Tainsky M. A., "The Li-Fraumeni syndrome :from clinical epidemiology to molecular genetics", *Am. J. Epidemiol.* 135:190-199, 1992.
- Sung P. And Klein H., "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions", *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7(10):739-50, 2006.
- Suriano G., Yew S., Ferreira P. Et al., "Characterization of a recurrent germ line mutation of the E-cadherin gene:implications for genetic testing and clinical management", *Clin. Cancer Res.* 11:5401-5409, 2005.
- Suter N. M., Ray R. M., Hu Y. W. Et al., "BRCA1 and BRCA2 mutations in women from Shanghai China", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(2):181-9, 2004.
- Szabo C. I., Wagner L. A., Francisco L. V. Et al., "Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence comparison among species", *Hum. Mol. Genet.* 5(9):1289-98, 1996.

Szabo C. I., King M. C., "Population genetics of BRCA1 and BRCA2", *Am. J. Hum. Genet.* 60(5):1013-20, 1997.

Szabo C., Masiello A., Ryan J. F., Brody L. C., "The breast cancer information core: database design, structure and scope", *Hum. Mut.* 16:123-131, 2000.

T

Tamimi R. M., Hankinson S. E., Spiegelman D. Et al., "Common ataxia telangiectasia mutated haplotypes and risk of breast cancer: a nested case-control study", *Breast Cancer Res.* 6:R416-422, 2004.

Taniguchi T., Garcia-Higuera I., Xu B. et al., "Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways", *Cell* 109(4):459-72, 2002.

Tarsounas M., Davies A. A., West S. C., "RAD51 localization and activation following DNA damage", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359:87-93, 2004.

Tavtigian S. V., Simard J., Rommens J. Et al., "The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds", *Nat. Genet.* 12(3):333-7, 1996.

Tavtigian S. V., Deffenbaugh A. M., Yin L. et al., "Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral", *J. Med. Genet.* 43(4):295-305, 2006.

Teare M. D., Cox A., Shorto J. Et al., "Heterozygote excess is repeatedly observed in females at the BRCA2 locus N372H", *J. Med. Genet.* 41(7):523-8, 2004.

Tesoriero A. A., Wong E. M., Jenkins M. A. Et al., "Molecular characterization and cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 splice site variants identified in multiple-case breast cancer families", *Hum. Mutat.* 26(5):495-507, 2005.

Thompson D., Easton D. F., Goldgar D. E., "A full-likelihood method for the evaluation of causality of sequence variants from family data", *Am. J. Hum. Genet.* 73:652-655, 2003.

Thompson D., Duodal S. Kirner J. F. R. Et al., "Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers", *J. Natl. Cancer Inst.* 97:813-822, 2005.

Thompson D., Antoniou A. C., Jenkins M. Et al., "Two ATM variants and breast cancer risk", *Hum. Mutat.* 25:594-595, 2005.

Thompson L. H., Hinz J. M., Yamada N. A., Jones N. J., "How fanconi anemia proteins promote the four Rs: replication, recombination, repair and recovery", *Environ. Mol. Mutagen.* 45:128-142, 2005.

Thoms K. M., Kuschal C., Emmert S., "Lessons learned from DNA repair defective syndromes", *Exp. Dermatol.* 16: 532-544, 2007.

Tibbetts R. S., Cortez D., Brumbaugh K. M., et al., "Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress", *Genes Dev.* 14:2989-3002, 2000.

Timmers C, Taniguchi T, Hejna J. et al., "Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2" *Mol. Cell.* 7(2):241-8, 2001.

Titus-Ernstoff L., Longnecker M. P., Newcomb P. A., et al. "Menstrual factors in relation to breast cancer risk", *Cancer epidemiol. Biomarkers Prev.* 7:783-789, 1998.

Toh G. T., Kang P., Lee S. S. Et al., "BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Malaysian women with early-onset breast cancer without a family history", *PLoS ONE.* 3(4):e2024, 2008.

Tommasi S., Crapolicchio A., Lacalamita R. Et al., "BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy", *Mutat. Res.* 578(1-2):395-405, 2005.

Tommasi S., Pilato B., Pinto R. Et al., "Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants", *Mutat. Res.* 644(1-2):64-70, 2008.

Torres D., Rashid M. U., Gil F. Et al., "High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia", *Breast Cancer Res. Treat.* 103(2):225-32, 2007.

Troudi W., Uhrhammer N., Sibille C. et al., "Contribution of the BRCA1 and BRCA2 mutations to breast cancer in Tunisia", *J. Hum. Genet.* 52(11):915-20, 2007.

Tutt A., Bertwistle D., Valentine J. Et al., "Mutation in BRCA2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences", *EMBO J.* 20:4704-4716, 2001.

Tworek H., Peng R., Fetzer S. et al., "Mutation analysis of BRCA1, TP53, and KRAS2 in ovarian and related pelvic tumors", *Cancer Genet. Cytogenet.* 112(2):105-18, 1999.

V

Vachon C.M., van Gils C.H., Sellers T.A., et al. "Mammographic density, breast cancer risk and risk prediction", *Breast Cancer Res.* (6):217,2007.

Vaheristo P., Bartkova J., Eerola H. Et al., "A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer", *Am. J. Hum. Genet.* 71:432-438, 2002.

Vallon-Christersson J., Cayanan C., Haraldsson K. Et al., "Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families", *Hum. Mol. Genet.* 10(4):353-60, 2001.

Van der Brandt P. A., Spiegelman D., Yaun S. S. et al., "Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk", *Am. J. Epidemiol.* 152:514-527, 2000.

Van der Hout A. H., Van den Ouweland A. M., Van der Luijt R. B. Et al., "A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2: application in a Dutch cancer clinic setting", *Hum. Mutat.* 27(7):654-66, 2006.

Varley J. M., McGown G., Thorncroft M. Et al., "Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families", *Cancer Res.* 57:3245-3252, 1997.

Vasen HF, Moslein G, Alonso A. Et al., “Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer)”, *J. Med. Genet.* 44: 353–362, 2007.

Vega A., Torres M., Martínez J. I. Et al., “Analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast and breast/ovarian cancer families shows population substructure in the Iberian peninsula”, *Ann. Hum. Genet.* 66(Pt 1):29-36, 2002.

Vehmanen P., Friedman L. S., Eerola H. Et al., “A low proportion of BRCA2 mutations in Finnish breast cancer families”, *Am. J. Hum. Genet.* 60(5):1050-8, 1997.

Velasco Sampedro E., Esteban Cardeñosa E., Infante Sanz M. Et al., “Molecular study of the BRCA1 and BRCA2 genes in 153 breast cancer families from Castilla and León (Spain): new nine unclassified variants identified”, *Med. Clin. (Barc)*, 119(12):441-5, 2002.

Velasco E., Infante M., Durán M. Et al., “Rapid mutation detection in complex genes by heteroduplex analysis with capillary array electrophoresis”, *Electrophoresis* 26(13):2539-52, 2005.

Venkitaraman A. R., “Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2”, *Cell* 108:171-182, 2002.

Verhoog L. C., van den Ouweland A. M., Berns E. Et al., “Large regional differences in the frequency of distinct BRCA1/BRCA2 mutations in 517 Dutch breast and/or ovarian cancer families”, *Eur. J. Cancer.* 37(16):2082-90, 2001.

Vickers M., Meade T., Darbyshire J., “WISDOM: history and early demise-was it inevitable?”, *Climacteric* 5:317-325, 2002.

Vogel K. J., Atchley D. P., Erlichman J. Et al., “BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Hispanic patients: mutation prevalence and evaluation of the BRCAPRO risk assessment model”, *J. Clin. Oncol.* 25(29):4635-41, 2007.

Vorechovsky I., Rasio D., Luo L. P. et al., “The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation”, *Cancer Res.* 56:2726-2732, 1996.

W

Wagner T. M., Möslinger R. A., Muhr D. Et al., “BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics”, *Int. J. Cancer* 77(3):354-60, 1998.

Wang B., Matsuoka S., Ballif B. A. Et al., “Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response”, *Science* 316(5828):1194-1198, 2007.

Wang B., Elledge S. J., “Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brc1/ Brcc36 complex in response to DNA damage”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(52):20759-63, 2007.

Wang H. C., Chou W. C., Shieh S. Y., Shen C. Y., “Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining”, *Cancer Res.* 66(3):1391-400, 2006.

- Wang Q., Zhang H., Kajino K., Greene M. I., "BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells", *Oncogene* 17:1939-1948, 1998.
- Wang R. H., Yu H., Deng C. X., "A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17108-17113.
- Wang Y., Cortez D., Yazdi P. Et al., "BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures", *Genes Dev.* 14(8):927-39, 2000.
- Wang W., "Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins", *Nature Reviews Genetics* 8:735-748, 2007.
- Wappenschmidt B., Fimmers R., Rhiem K. Et al., "Strong evidence that the common variant S384F in BRCA2 has no pathogenic relevance in hereditary breast cancer", *Breast Cancer Res.* 7(5):R775-9, 2005.
- Ward B. D., Hendrickson B. C., Judkins T. Et al., "A multi-exonic BRCA1 deletion identified in multiple families through single nucleotide polymorphism haplotype pair analysis and gene amplification with widely dispersed primer sets", *J. Mol. Diagn.* 7(1):139-42, 2005.
- Wárlám-Rodenhuis C. C., Koot V. C., van der Luijt R. B., Vasen H. F., Ausems M. G., "A prospective study on predictive factors linked to the presence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients", *Eur. J. Cancer.* 41(10):1409-15, 2005.
- Weber B. L. and Nathanson K. L., "Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer", *Eur. J. Cancer* 36:1193-1199, 2000.
- Weber F., Shen L., Fukino K. Et al., "Total-genome analysis of BRCA1/2-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation", *Am. J. Hum. Genet.* 78(6):961-72, 2006.
- Weissman AM., "Themes and variations on ubiquitylation", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2(3):169-78, 2001.
- Weitzel J. N., Lagos V., Blazer K. R., et al., "Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:1666-1671, 2005.
- Wenham R. M., Schildkraut J. M., McLean K. Et al., "Polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk of epithelial ovarian cancer", *Clin. Cancer Res.* 9(12):4396-403, 2003.
- Westerman A. M., Entius M. M., de Baar E. Et al., "Peutz-Jeghers syndrome: 78-year follow-up of the original family", *Lancet* 353:1211-1215, 1999.
- Williams R. S., Chasman D. I., Hau D. D. Et al., "Detection of protein folding defects caused by BRCA1-BRCT truncation and missense mutations", *J. Biol. Chem.* 278(52):53007-16, 2003.
- Wingo P. A., Lee N. C., Ory H. W., et al., "Age-specific differences in the relationship between oral contraceptive use and breast cancer", *Obstet. Gynecol.* 78:161-170, 1991.
- Woods M., Barnett J. B., Spiegelman D. Et al., "Hormone level during dietary changes in premenopausal African American women", *J. Natl. Cancer Inst.* 88:1360-1374, 1996.
- Woodward A. M., Davis T. A., Silva A. G., Kirk J. A., Leary J. A.; kConFab Investigators, "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(5):e31, 2005.

Wong J., Ionescu D., Ingles C.J., “Interaction between BRCA2 and replication protein A is compromised by a cancer-predisposing mutation in BRCA2”, *Oncogene* 22:28-33, 2003.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J. Et al., “Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2”, *Nature* 378(6559):789-92, 1995; Erratum in: *Nature* 379(6567):749, 1996.

Wu K., Hinson S. R., Ohashi A. et al., “Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants”, *Cancer Res.* 65:417-426, 2005.

Wu W., Koike A., Takeshita T., Ohta Tomohiko, “The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions”, *Cell division* 3:1, 2008.

Wu W., Nishikawa H., Hayami R. Et al., “BRCA1 ubiquitinates RPB8 in response to DNA damage”, *Cancer Res.* 67(3):951-958, 2007.

X

Xia B., Sheng Q., Nakanishi K. et al., “Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2”, *Mol. Cell.* 22(6):719-29, 2003.

Xia F., Taghian D. G., DeFrank J. S. Et al., “Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(15):8644-9, 2001.

Xiao W. And Oefner P. J., “Denaturing high-performance liquid chromatography: A review”, *Hum. Mutat.* 17:439-474, 2001.

Xie W., Mertens J. C., Reiss D. J. Et al., “Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study”, *Cancer Res.* 62:497-505, 2002.

Xu B., Kim S., Kastan M. B., “Involvement of BRCA1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing radiation”, *Mol. Cell Biol.* 21:3445-3450, 2001.

Xu B., O'Donnell A. H., Kim S. T., Kastan M. B., “Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing radiation”, *Cancer Res.* 62:4588-4591, 2002.

Xu X., Wagner K. U. , Larson D. Et al., “Conditional mutation of BRCA1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation”, *Nat. Genet.* 22:37-43, 1999.

Y

Yang H., Li Q., Fan J., Holloman W.K., and Pavletich N.P., “The BRCA2 homolog Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction”, *Nature* 433: 653-657, 2005.

Yang H., Jeffrey P. D., Miller J. et al., "BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure", *Science*. 297(5588):1837-48, 2002.

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

Yassaee V. R., Zeinali S., Harirchi I. Et al., "Novel mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian women with early-onset breast cancer", *Breast Cancer Res.* 4(4):R6, 2002.

Ye Q., Hu Y. F., Zhong H. Et al., "BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations", *J. Cell Biol.* 155:911-921, 2001.

Yuan S-S.F., Lee S-Y., Chen G. Et al., "BRCA2 is required for ionizing-radiation-induced assembly of RAD51 complex in vivo", *Cancer Res.* 59:3547-3551, 1999.

Yu V.P.C.C., Köehler M., Steinlein C. et al., "Gross chromosomal rearrangements and genetic Exchange between non-homologous chromosomes following BRCA2 inactivation", *Genes. Dev.* 14:1400-1406, 2000.

Yu X., Chini C. C., He M., Mer G., Chen J., "The BRCT domain is a phospho-protein binding domain", *Science* 302(5645):636-639, 2003.

Yu X., Fu S., Lai M., Baer R., Chen J., "BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP", *Genes Dev.* 20(13):1721-1726, 2006.

Yue P., Melamud E., Moulton J., "SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies", *BMC Bioinformatics* 7:166, 2006 (a)

Yue P, Moulton J., "Identification and analysis of deleterious human SNPs", *J. Mol. Biol.* 356(5):1263-74, 2006. (b)

Z

Zeegers M. P., van Poppel F., Vlietinck R., Spruijt L., Ostrer H., "Founder mutations among the Dutch", *Eur. J. Hum. Genet.* 12(7):591-600, 2004.

Zhan Q., Antinore M. J., Wang X. W., et al., "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45", *Oncogene* 18:2892-2900, 1999.

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

Zhang S. M., "Role of vitamins in the risk, prevention, and treatment of breast cancer", *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 16:19-25, 2004.

Zhao G. Y., Sonoda E., Barber L. J. Et al., "A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination", *Mol. Cell* 25(5):663-675, 2007.

Zheng L., Annab L. A., Afshari C. A., Lee W. H., Boyer T. G., "BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(17):9587-92, 2001.

Zhong Q., Chen C. F., Li S. et al., "Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response", *Science.* 285(5428):747-50, 1999.

Zhou X., Iversen E. S., Parmigiani G., "Classification of Missense Mutations of Disease Genes", *J. Am. Stat. Assoc.* 100:51-60, 2005.

Zhuang J., Zhang J., Willers H. Et al., "Checkpoint Kinase2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of non-homologous-end-joining", *Cancer Res.* 66:1401-1408, 2006.

Ziegler A. M., Hoover R. N., Pike M. C., et al., "Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women", *J. Natl. Cancer Inst.* 85:1819-1827, 1993.

Zuhlke K. A., Madeoy J. J., Beebe-Dimmer J. Et al., "Truncating BRCA1 mutations are uncommon in a cohort of hereditary prostate cancer families with evidence of linkage to 17q markers", *Clin. Cancer Res.* 10(18 Pt 1):5975-80, 2004.